

**Molekulargenetische Assoziationsstudie zu
Polymorphismen der Kandidatengene $TGF\alpha$, $TGF\beta 3$ und
FOXF2 bei nicht-syndromalen LKGS-Spalten**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat)**

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Dipl.-Hum. Biol. Juliane Strien

geboren am 11.08.1984 in Sömmerda

Gutachter

1. Prof. Dr. Gita Mall (Jena)
2. PD Dr. Kerstin Voigt (Jena)
3. Prof. Dr. Heidi Pfeiffer (Münster)

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.05.2014

I Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------------|--|
| A | Adenin |
| Abb. | Abbildung |
| AD | Aktivierungsdomäne |
| AgNO ₃ | Silbernitrat |
| Ala | Alanin |
| APC-Gen | Adenomatöses Polyposis Coli Gen |
| APP-Gen | Amyloid-β Precursor Protein-Gen |
| APS | Ammoniumperoxidsulfat |
| Asn | Asparagin |
| ATM-Gen | Ataxia Telangiectasia Mutated-Gen |
| bp | Basenpaare |
| BMP | Bone morphogenic Protein |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| C | Cytosin |
| CHD7-Gen | Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 7 |
| χ ² -Test | Chi-Quadrat-Test |
| ChIP | Chromatin-Immunpräzipitation |
| CRISPLD2-Gen | Cysteine-Rich Secretory Protein LCCL Domain Containing 2-Gen |
| CSPG | Chondroitinsulfat-Proteoglykan |
| Δ | Deletion |
| DNA | Desoxyribonucleic acid |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphat |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| dNTP | 2'-Desoxynukleosidtriphosphat |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EGF | Epidermal Growth Factor |
| EMSA | Electrophoretic Mobility Shift Assay |
| EMT | epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung |
| et al. | et alteri (und andere) |
| ETDT | erweiterter Transmission-Disequilibrium-Test |
| FMR1-Gen | Fragile X Mental Retardation-Gen |
| FOXF2 | Forkhead Box F2 |
| FRET | Förster-Resonanzenergietransfer |
| fwd | forward (Primer) |
| G | Guanin |
| Gln | Glutamin |
| Glu | Glutaminsäure |
| Gly | Glycin |

| | |
|---------------------------------|---|
| GS | (isolierte) Gaumenspalte |
| GSPT1-Gen | G1 To S Phase Transition 1-Gen |
| His | Histidin |
| HNO ₃ | Salpetersäure |
| IPEX | Immundysregulation, Polyendokrinopathie und Enteropathie, X-chromosomales Syndrom |
| IRF6 | Interferon regulatory factor 6 |
| I-SMADs | inhibitorische SMADs |
| LD | Linkage Disequilibrium = Kopplungsungleichgewicht |
| Leu | Leucin |
| LKGS | Lippen-Kiefer-Gaumenspalte (auch LKGS-Spalte = Lippen-Kiefer-Gaumen-Segel-Spalte) |
| LK± GS | Lippen-Kiefer-Spalte mit bzw. ohne Gaumenspalte |
| LKS | Lippen-Kiefer-Spalte |
| MAD2L1-Gen | MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)-Gen |
| MAP-Kinase | mitogen-activated protein Kinase |
| MEE | Medial edge epithelium („Epithel der medialen Kante“) |
| MES | midline epithelial seam (Mittellinienepithelsaum) |
| Met | Methionin |
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |
| MSX1 | Msh homeobox 1 |
| MTHFR | Methylentetrahydrofolat-Reduktase |
| Na ₂ CO ₃ | Natriumcarbonat |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| NLS | Kernlokalisierungssequenz |
| OMIM | Online Mendelian Inheritance in Man |
| PAA(-Gel) | Polyacrylamid(-Gel) |
| PAH-Gens | Phenylalanin-Hydroxylase |
| PAX9-Gen | Paired box gene 9 |
| PCR | Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion) |
| PDA | Piperazin di-Acrylamid |
| PDK1 | 3-phosphoinositide-dependent kinase-1 |
| PI-3 Kinase | Phosphatidylinositol-3 Kinase |
| PKB | Proteinkinase B |
| Pro | Prolin |
| PRODH-Gen | Proline Dehydrogenase (Oxidase) 1-Gen |
| rev | reverse (Primer) |
| RFLP | Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| R-SMADs | Rezeptor-regulierte SMADs |
| Ser | Serin |

| | |
|--------------|---|
| Shh | Sonic Hedgehog |
| SMAD | “similar to MAD”; auch Kombination aus den Worten MAD und SMA (homologe Gene in Drosophila und C. elegans) |
| Smo | Smoothened (Transmembranprotein) |
| SNP | Single Nucleotide Polymorphism (Einzelnukleotid-Polymorphismus) |
| SSCP | single strand conformation polymorphism |
| T | Thymin |
| Tab. | Tabelle |
| TAK1 | TGF β aktivierte Kinase 1 |
| TBP | TATA-Bindeprotein |
| TDT | Transmission-Disequilibrium-Test |
| TEMED | Tetramethylethyldiamin |
| TGF α | Transforming Growth Factor alpha |
| TGF β | Transforming Growth Factor beta |
| Thr | Threonin |
| Tyr | Tyrosin |
| UTR | Untranslatierte Region |
| Wnt | Signalprotein, Name setzt sich zusammen aus <i>Wg</i> für <i>Wingless</i> und <i>Int-1</i> |
| wt | Wildtyp |

II Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|------------|
| I Abkürzungsverzeichnis | III |
| II Inhaltsverzeichnis | VI |
| III Zusammenfassung | IX |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Formation von Gesicht und Gaumen | 3 |
| 1.2 Spaltarten und deren Genese | 6 |
| 1.3 Ätiologie der LKGS-Spalten | 7 |
| 1.3.1 Erbllicher Einfluss auf die Spaltbildung | 8 |
| 1.3.2 Kandidatengene | 8 |
| 1.3.2.1 <i>Genfamilie der Transforming Growth Factors (TGF)</i> | 9 |
| 1.3.2.1.1 Kandidatengen TGF α | 10 |
| 1.3.2.1.2 Kandidatengen TGF β 3 | 12 |
| 1.3.2.2 <i>Forkhead-Box-Proteine</i> | 15 |
| 1.3.2.2.1 Kandidatengen FOXF2 | 16 |
| 1.4 Assoziations- und Fall-Kontrollstudien | 18 |
| 2 Ziele der vorliegenden Arbeit | 20 |
| 3 Methodik | 21 |
| 3.1 Patienten- und Kontrollkollektiv | 21 |
| 3.2 Experimentelle Methoden | 21 |
| 3.2.1 DNA-Isolation aus Mundschleimhautabrieben | 21 |
| 3.2.2 DNA-Isolation aus Blut | 22 |
| 3.2.3 DNA-Konzentrationsbestimmung | 22 |
| 3.2.4 PCR-Amplifikation | 22 |
| 3.2.4.1 <i>Multiplex PCR zur Genotypisierung der Polymorphismen TGFα-Δ4bp, TGFα-D2S443 und TGFβ3-Δ6bp</i> | 22 |
| 3.2.4.2 <i>PCR zur Genotypisierung des Substitutionspolymorphismus T\rightarrowC im Gen TGFβ3 (rs3917200)</i> | 24 |
| 3.2.4.3 <i>PCR zur Genotypisierung des Gens FOXF2</i> | 25 |
| 3.2.5 Fragmentlängenanalyse | 28 |
| 3.2.6 Gelelektrophorese | 29 |
| 3.2.7 Aufreinigung der PCR-Produkte | 30 |
| 3.2.8 DNA-Sequenzierung | 30 |
| 3.3 Statistische Auswertung der Assoziationsstudie | 31 |
| 3.3.1 Fall-Kontroll-Studie | 32 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 3.3.2 | familienbasierte Assoziationsstudie | 34 |
| 4 | Ergebnisse | 35 |
| 4.1 | Transforming Growth Factor alpha (TGFα)..... | 35 |
| 4.1.1 | Analyse des Polymorphismus TGF α - Δ 4bp | 35 |
| 4.1.1.1 | <i>Fall-Kontroll-Analyse zum Polymorphismus TGFα-Δ4bp bei LK\pmGS-Patienten.....</i> | <i>36</i> |
| 4.1.1.2 | <i>Fall-Kontroll-Analyse zum Polymorphismus TGFα-Δ4bp bei Patienten mit isolierter GS.....</i> | <i>37</i> |
| 4.1.2 | Analyse des Polymorphismus D2S443..... | 38 |
| 4.1.2.1 | <i>Fall-Kontroll-Analyse zum Polymorphismus D2S443 bei LK\pmGS-Patienten.....</i> | <i>39</i> |
| 4.1.2.2 | <i>Fall-Kontroll-Analyse zum Polymorphismus D2S443 bei Patienten mit isolierter GS.....</i> | <i>40</i> |
| 4.1.3 | Fall-Kontroll-Analyse zum Genotyp TGF α | 41 |
| 4.2 | Transforming Growth Factor beta 3 (TGFβ3)..... | 43 |
| 4.2.1 | Analyse des Polymorphismus TGF β 3- Δ 6bp | 43 |
| 4.2.1.1 | <i>Fall-Kontroll-Analyse zum Polymorphismus TGFβ3-Δ6bp bei LK\pmGS-Patienten.....</i> | <i>43</i> |
| 4.2.1.2 | <i>Fall-Kontroll-Analyse zum Polymorphismus TGFβ3-Δ6bp bei Patienten mit isolierter GS.....</i> | <i>44</i> |
| 4.2.2 | Analyse des Substitutionspolymorphismus T \rightarrow C im Gen TGF β 3 (rs3917200) .. | 45 |
| 4.2.2.1 | <i>Fall-Kontroll-Analyse zum Polymorphismus TGFβ3-rs3917200 bei LK\pmGS-Patienten.....</i> | <i>46</i> |
| 4.2.2.2 | <i>Fall-Kontroll-Analyse zum Polymorphismus TGFβ3-rs3917200 bei Patienten mit isolierter GS.....</i> | <i>47</i> |
| 4.2.2.3 | <i>Analyse der Punktmutation -1G\rightarrowC.....</i> | <i>47</i> |
| 4.2.3 | Fall-Kontroll-Analyse zum Genotyp TGF β 3 | 48 |
| 4.3 | Die Kombination der Polymorphismen im Bereich TGFα und TGFβ3..... | 49 |
| 4.4 | Forkhead-Box F2 (FOXF2)..... | 50 |
| 4.4.1 | Polymorphismen des FOXF2-Gens (Exon 1)..... | 50 |
| 4.4.1.1 | <i>Analyse des Polymorphismus rs78728576 - c.97GCC[9]+[10]</i> | <i>50</i> |
| 4.4.1.2 | <i>Analyse der Punktmutation c.123C\rightarrowT.....</i> | <i>52</i> |
| 4.4.1.3 | <i>Analyse des Polymorphismus rs72667003 – c.262G\rightarrowA.....</i> | <i>52</i> |
| 4.4.1.4 | <i>Analyse der Punktmutation c.344G\rightarrowA</i> | <i>53</i> |
| 4.4.1.5 | <i>Analyse des Polymorphismus rs34317327/rs58230522 - c.904GGC[5]+[6].....</i> | <i>54</i> |
| 4.4.2 | Polymorphismen des FOXF2-Gens (Exon 2)..... | 56 |
| 4.4.2.1 | <i>Analyse der Punktmutation c.1177C\rightarrowA.....</i> | <i>56</i> |
| 4.4.2.2 | <i>Analyse der Punktmutation c.1272C\rightarrowT.....</i> | <i>57</i> |

| | | |
|------------|--|------------|
| 4.4.2.3 | Analyse des Polymorphismus rs2293783 – c.1284T→C | 57 |
| 4.4.2.4 | Analyse des Polymorphismus rs45600838 – *25G→A | 60 |
| 4.4.3 | Fall-Kontroll-Analyse zum Genotyp FOXF2 | 60 |
| 4.4.4 | Zusammenfassung der ermittelten genetischen Varianten im Bereich FOXF2 .. | 63 |
| 4.5 | Familienbasierte Assoziationsanalyse | 65 |
| 5 | Diskussion | 69 |
| 5.1 | Methodische Aspekte | 69 |
| 5.1.1 | Die Problematik der Amplifikation GC-reicher DNA-Sequenzen | 69 |
| 5.1.2 | Etablierung von effektiven PCR-Systemen mit minimaler DNA-Menge..... | 71 |
| 5.2 | Analyse der Polymorphismen im Kandidatengen TGFα | 72 |
| 5.2.1 | Der Polymorphismus TGFα-Δ4bp..... | 72 |
| 5.2.2 | Der Polymorphismus TGFα-D2S443 | 75 |
| 5.3 | Analyse der Polymorphismen im Kandidatengen TGFβ3 | 77 |
| 5.3.1 | Der Polymorphismus TGFβ3-Δ6bp..... | 78 |
| 5.3.2 | Der Polymorphismus TGFβ3-rs3917200 (-38T→C)..... | 79 |
| 5.4 | Kombinierte Betrachtung der Polymorphismen im Bereich TGFα und TGFβ3 ... | 80 |
| 5.5 | Mutationsanalyse des Kandidatengens FOXF2 | 82 |
| 5.5.1 | Die Längenpolymorphismen c.97GCC[9]+[10] und c.904GGC[5]+[6] | 83 |
| 5.5.2 | Die Einzelnukleotidpolymorphismen c.262G→A, c.1284T→C und *25G→A | 87 |
| 5.5.3 | Seltene Varianten im FOXF2 Gen (c.123C→T, c.344G→A, c.1177C→A, c.1272C→T) | 91 |
| 5.5.4 | Betrachtung des kombinierten Genotyps FOXF2 | 95 |
| 5.6 | Gesamtschau aller ermittelten Sequenzvarianten | 96 |
| 5.7 | Schlussfolgerung und Ausblick | 97 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 99 |
| 7 | Anhang | 113 |
| 8 | Lebenslauf | 114 |
| 8.1 | Liste eigener Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge..... | 115 |
| 9 | Ehrenwörtliche Erklärung..... | 116 |
| 10 | Danksagung..... | 117 |

III Zusammenfassung

Lippen-Kiefer-Gaumen-(Segel)-Spalten (LKGS) zählen mit einer Inzidenz von ca. 1:700-1:1000 zu den häufigsten angeborenen Anomalien des Menschen. Bisher ist die Ätiologie, vor allem von Spalten, die nicht im Rahmen eines Syndroms auftreten, weitgehend unverstanden. Gegenwärtig geht man von einer multifaktoriellen Genese unter Beteiligung polygener Risikofaktoren im Zusammenhang mit exogenen Einflüssen aus. Der Nachweis familiärer und populationsabhängiger Häufungen verdeutlicht den hohen Stellenwert der genetischen Komponente. Daher fokussieren zahlreiche nationale und internationale Arbeitsgruppen auf die Untersuchung potenzieller Kandidatengene. Darunter finden sich Gene deren Expression während der Gaumenentwicklung in den entsprechenden embryonalen Geweben erhöht ist und deren Produkte Auswirkungen auf die Zellproliferation und Differenzierung haben. Dazu zählen die Transforming Growth Factors TGF α und TGF β 3 sowie das Forkhead-Box Protein FOXF2. Sowohl für TGF β 3 als auch für FOXF2 konnte bereits an transgenen Mäusen gezeigt werden, dass Veränderungen in der Sequenz der betreffenden Gene eine Spaltbildung hervorrufen. Assoziationsstudien und familienbasierte Untersuchungen anhand unterschiedlicher humaner Populationen zu Polymorphismen in den Bereichen des TGF α -Gens (eine 4bp-Deletion im Intron 5 & der Längenpolymorphismus D2S443) und des TGF β 3-Gens (eine 6bp Deletion der 5'-UTR & der SNP rs3917200) lieferten bisher sehr heterogene Ergebnisse. Angesichts dieser inkonsistenten Daten wurden diese vier Polymorphismen in der vorliegenden Arbeit mittels Fall-Kontroll-Studie an einem mitteldeutschen Kollektiv untersucht. In diesem Rahmen wurde weiterhin die codierende Sequenz des neuen Kandidatengens FOXF2 auf Mutationen und Polymorphismen geprüft. Diese Arbeit stellt die erste Assoziationsanalyse zu FOXF2 in Verbindung mit nicht-syndromalen LKGS dar. Ziel war es anhand von 75 Trägern einer isolierten, nicht syndrom-assoziierten Spalte und 105 Kontrollpersonen ohne familiäre Spaltanamnese mögliche signifikante Häufungen von genetischen Veränderungen bzw. deren Kombination aufzudecken. Weiterhin stand zu zehn Patienten genetisches Material der Eltern zur Verfügung. Aufgrund der zeitlich getrennten embryonalen Entwicklung von Lippen-Kiefer-Spalten und isolierten Gaumenspalten wurden die Patienten hinsichtlich ihres Phänotyps in diese zwei Subgruppen unterteilt.

Für die Analyse der drei Längenpolymorphismen wurde eine Multiplex-PCR etabliert. Der SNP im TGF β 3-Gen sowie das komplette FOXF2-Gen wurde mittels DNA-Sequenzierung untersucht. Grundlage hierfür war die Erstellung von adäquaten Methoden zur Amplifikation extrem GC-reicher DNA-Abschnitte.

Hinsichtlich der Allelverteilung der Polymorphismen im TGF α -Gen zeigte sich, dass kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen zu verzeichnen war und somit keine Assoziation von LKGS und einer der untersuchten Allelausprägungen vorliegt. Für den Mikrosatelliten D2S443 wurde ein bisher nicht beschriebenes Allel (18.1) ermittelt, welches ausschließlich im Patientenkollektiv auftrat. Für die Allelhäufigkeitsverteilung der beiden Polymorphismen im TGF β 3-Gen ließ sich ebenfalls keine signifikante Abweichung zwischen der Spaltträgergruppe und der Kontrollgruppe feststellen. Auch hinsichtlich einer Unterscheidung nach Geschlecht wurde keine Signifikanz nachgewiesen. Gleichmaßen erbrachte die Kombination der Genotypen an den vier Loci keinen Hinweis auf eine Assoziation. Durch die vollständige Sequenzierung des FOXF2-Gens konnten für das gesamte Kollektiv neun Abweichungen zur Referenzsequenz ermittelt werden. Bei fünf dieser Veränderungen handelt es sich um Polymorphismen, welche mit >1% in der Gesamtpopulation auftreten. Zwei der vier seltenen Mutationen traten nur bei gesunden Kontrollen auf; zwei weitere hingegen ausschließlich bei Patienten. Ob diese Varianten funktionelle Auswirkungen haben und einen veränderten Phänotyp hervorrufen, müsste durch Folgeuntersuchungen geklärt werden.

Somit ist davon auszugehen, dass die in der vorliegenden Arbeit analysierten Sequenzvarianten die Suszeptibilität für eine Spaltbildung nicht maßgeblich erhöhen. Folglich müssen weitere Forschungen zur Suche nach den verantwortlichen Genen angestrebt werden.

1 Einleitung

Lippen-Kiefer-Gaumen-(Segel)spalten (LKGS bzw. LKGS-Spalten) stellen eine sehr heterogene Gruppe von angeborenen Fehlbildungen des Gesichts bzw. Mundraums dar. Dazu zählen sowohl isolierte Gaumenspalten (GS) als auch Lippenspalten mit oder ohne Assoziation zu einer Anomalie des Kiefers bzw. des Gaumens (LK±GS). LKGS können ein- und beidseitig (uni- bzw. bilateral) auftreten. Unterschiedliche Phänotypen sind beispielhaft in Abbildung 1 dargestellt. Des Weiteren unterscheidet man zwischen „syndromalen“ Spalten, welche in Kombination mit anderen Symptomen im Rahmen eines Syndroms vorkommen, und „nicht-syndromalen“ Spalten, wobei der Patient keine weiteren Missbildungen aufweist.



Abb.1 Beispielhafte Darstellung a) einer Mikroform der unilateralen Lippenspalte, b) einer unilateralen LKGS, c) einer bilateralen LKGS (Desrosiers et al., 2009; Wolfe & Mejia, 2013)

Solche kraniofazialen Dysplasien können erhebliche psychische und physische Auswirkungen auf den Betroffenen haben. Neben dem ästhetischen Aspekt treten gehäuft funktionale Probleme beim Schlucken, Sprechen und der Nasenatmung auf. Darüber hinaus sind eine Mitbeteiligung des auditorischen Systems mit Verzögerung der Reifeentwicklung sowie Mittelohrkomplikationen und ein gestörtes Kieferwachstum mit Zahnfehlstellungen nicht selten Teil des klinischen Bildes eines Spaltträgers.

Mit einer durchschnittlichen Inzidenz von 1:700 (EUROCAT Special Report, 2002) bis 1:1000 (IPDTC, 2011) Geburten zählen LKGS-Spalten zu den häufigsten angeborenen Anomalien des Menschen, wobei die Prävalenz in unterschiedlichen geografischen Regionen stark variiert. So konnte eine internationale Studie der IPDTC Working Group der WHO 2011 feststellen, dass in Japan ein erhöhtes Auftreten von Spalten zu verzeichnen ist, während in Südafrika mit 1:2000 die niedrigste Prävalenz vorliegt (Abb. 2).

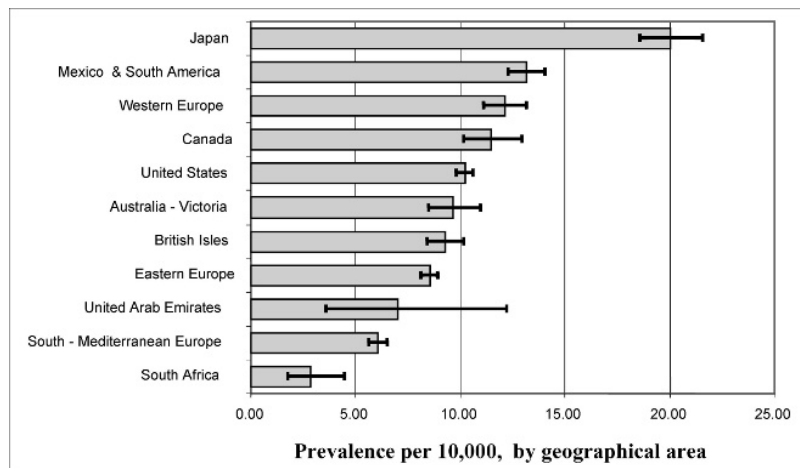


Abb. 2 Geografische Prävalenz von LK±GS (IPDTC, 2011)

Selbst innerhalb Europas zeigen sich zum Teil recht große Unterschiede in der Verbreitung von (nicht-syndromalen) LKGS-Spalten. Dabei fällt auf, dass Deutschland und Finnland europaweit die höchste Prävalenz aufweisen, welche bis zu dreimal so hoch ist wie in südeuropäischen Ländern wie Spanien und Portugal (Abb. 3).

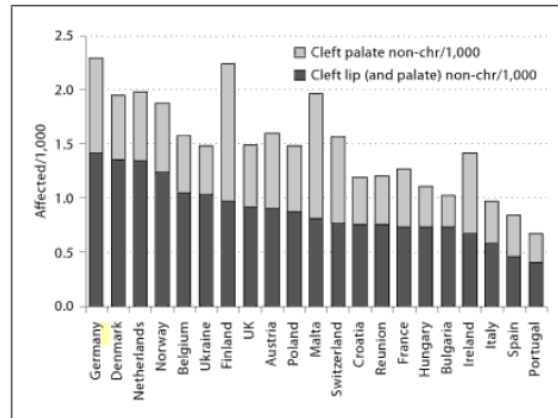


Abb. 3 Variierende Prävalenz von nicht syndromalen LK±GS und isolierten GS innerhalb Europas (Mossey & Modell, 2012)

Die phänotypische Ausprägung der Spalten zeigt eine große Variationsbreite von Mikroformen über einseitige oder partielle Spalten bis hin zu totalen beidseitigen Spalten. Abhängig ist dies vom Zeitpunkt der Störung der Embryogenese. Sader (2009) gibt an, dass bei einseitiger Spaltbildung die linke Seite bis zu dreimal häufiger betroffen ist als die Rechte. Bei Jungen treten etwa doppelt so häufig LKGS-Spalten auf, wohingegen isolierte Gaumenspalten mit einer Häufigkeit von 2:1 eher Mädchen betreffen. Gesamt betrachtet sind 80% der bilateralen und 70% der

unilateralen Lippen(Kiefer-)spalten auch mit Gaumenspalten assoziiert (Gorlin et al., 2001). Man kann davon ausgehen, dass ca. 50-75% der Spalten spontan bzw. nicht als Teilsymptom eines bestehenden Syndroms auftreten (Jones, 1988). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass bei 44-64% der Spaltträger weitere assoziierte Anomalien auftreten (Rollnick & Pruzansky, 1981; Shprintzen et al., 1985). Zwar konnte bisher die genaue Ätiologie der Spaltbildung, vor allem bei den nicht-syndromalen LKGS-Spalten, noch nicht vollständig aufgeklärt werden, dennoch besteht kein Zweifel an einer genetischen Komponente des Entstehungsmechanismus.

1.1 Formation von Gesicht und Gaumen

Um die Auswirkungen genetischer Veränderungen auf die Bildung von Kiefer und Gaumen beurteilen zu können, muss man zuerst die gesunde Entwicklung betrachten. Die Genese des humanen Gesichtes und des Gaumens findet während der 4. bis 12. Embryonalwoche statt. Dabei entstehen am Ende der 4. Woche Gesichtswülste, welche aus eingewanderten Mesenchymzellen der Neuralleiste bzw. dem ersten Schlundbogen hervorgehen. Zu dieser Zeit vereinigen sich die zwei Unterkieferwülste zur Mandibula, der Unterlippe und dem Kinn. Anhand der Abbildung 4 kann man erkennen, wie die paarigen Oberkieferfortsätze bis zur 7. Woche nach medial wachsen und mit den fusionierenden medialen Nasenwülsten verschmelzen.

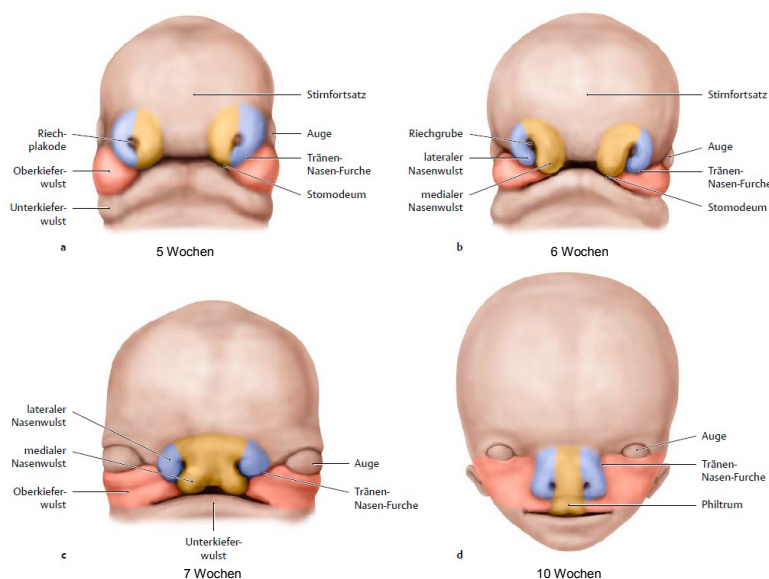


Abb. 4 Genese des Gesichtes (Aus: Schünke et al. 2009)

Auf diese Weise entsteht die Oberlippe im Bereich des Philtrums aus den medialen Nasenwülsten, während die lateralen Anteile ihren Ursprung im Oberkieferwulst haben. Aus den vereinigten medialen Nasenwülsten entstehen oberflächlich das Philtrum, die Nasenspitze und der Nasenrücken. Gleichzeitig wird in der Tiefe das so genannte Zwischenkiefersegment gebildet. Dieses setzt sich aus dem die vier Schneidezähne tragenden Oberkieferanteil und dem primären Gaumen zusammen. Die Wangen, der Oberkiefer und der sekundäre Gaumen wiederum entwickeln sich aus den sich vergrößernden Oberkieferfortsätzen. Aus den ebenfalls mit den Oberkieferfortsätzen verschmelzenden lateralen Nasenwülsten entstehen später die Nasenflügel.

Der Gaumen ist die Grenze zwischen Mund- und Nasenhöhle und setzt sich aus primärem und sekundärem Gaumen zusammen, wobei der harte Teil des sekundären Gaumens (Palatum durum) in das knochenfreie, weiche Gaumensegel (Velum palatinum) übergeht. Wie zuvor beschrieben entsteht der primäre Gaumen bereits etwa in der 6. Entwicklungswoche durch die Fusion der medialen Nasenwülste und wird zum Os incisivum. Unabhängig davon bringen die Oberkieferwülste ab der 6. Woche zwei vertikal stehende Fortsätze hervor, die Gaumenplatten. Diese richten sich in der 7. Woche, nach der Verlagerung der Zunge nach unten, horizontal auf und vereinigen sich in der Mittellinie zum sekundären Gaumen (s. Abb. 5). Weiterhin erfolgt ein Zusammenschluss mit dem primären Gaumen, wobei das verbleibende Foramen incisivum auch im Erwachsenen noch die Grenze zwischen beiden darstellt.

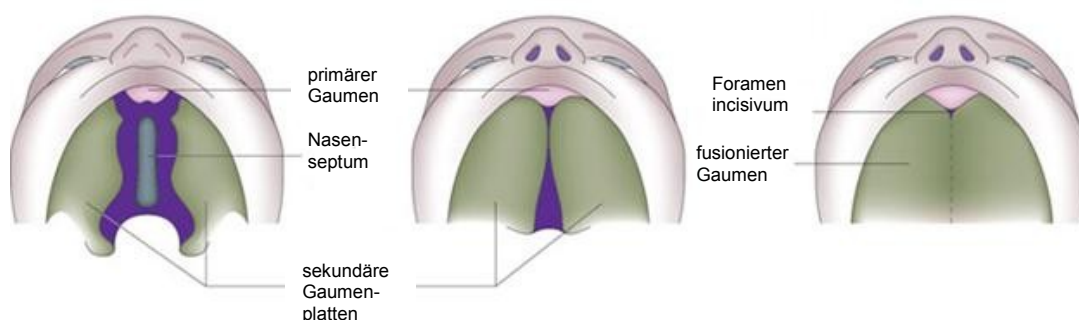


Abb. 5 Genese des Gaumens, Bearbeitung nach Dixon et al. 2011

Während der Fusion der Gaumenplatten bildet sich von ventral nach dorsal am Mittellinienepithel eine Epithelnaht, die auch als „Epithel der medialen Kante“ (medial

edge epithelium, MEE) bezeichnet wird. Zwischen der 8. und der 12. Embryonalwoche erfolgt eine Degeneration des MEE wodurch eine einheitliche Bindegewebsplatte entsteht (Ferguson, 1988). Außerdem findet eine Transformation der Epithelzellen zu Mesenchym statt (EMT) (Fitchett & Hay, 1989; Vaziri Sani et al., 2005). Auch eine Migration der MEE-Zellen in orale und nasale Bereiche des Gaumens wird diskutiert (Jin & Ding, 2006). Nach der kompletten Verschmelzung der Gaumenplatten beginnt die Ossifikation des ventralen Bereiches und bildet so den harten Gaumen.

Es ist seit Langem bekannt, dass gerade während des sehr frühen Entwicklungsschrittes des vertikalen Wachstums der Gaumenplatten eine Induktion der Spaltbildung durch exogene Noxen wie Medikamente erfolgt (Salomon & Pratt, 1979). Nichtsdestotrotz ist dieser Schritt der am wenigsten experimentell untersuchte. Burdett, Waterfield & Shah (1988) konnten zeigen, dass in zwei Phasen der frühen Palatogenese eine gesteigerte DNA-Synthese auftritt; zum einen während der initialen Proliferation der Gaumenfortsätze aus den Oberkieferwülsten und fortschreitend während der vertikalen Elongation dieser. Neben der erhöhten Aktivität der DNA-Polymerase liegt auch eine verstärkte Expression der MAP-Kinase vor, was wiederum über Phosphorylierungskaskaden Einfluss auf die Zellproliferation hat (Young et al., 1997). Diese Mechanismen stellen molekulare Angriffspunkte für Mutagene dar und erhöhen so das Risiko einer Spaltbildung.

Der substanzielle Schritt der Elevation, des horizontalen Aufrichtens der Gaumenplatten, wird vor allem durch mesenchymale Proliferation und Veränderungen der extrazellulären Matrix bedingt. Besonders die Akkumulation von Glykosaminoglykanen, speziell Hyaluronsäure, ist entscheidend (Pratt et al., 1973). Diese Proteine können große Mengen von Wasser binden und so eine extreme Volumenzunahme hervorrufen. Die Stimulation mesenchymaler Zellen zur Hyaluronsäuresynthese erfolgt höchstwahrscheinlich über die Wachstumsfaktoren EGF und TGF β (D'Angelo & Greene, 1991; Sharpe & Ferguson, 1988; Turley et al., 1985). Weiterhin tragen sowohl die Kontraktilität der Mesenchymzellen als auch Kollagenfasern, welche die Gaumenplatten von der Basis zur Spitze hin durchziehen, zur Aufrichtung bei (Bulleit & Zimmerman, 1985; Zimmerman et al., 1983). Die molekularen Grundlagen der einzelnen Entwicklungsschritte während der Gaumenentwicklung sind jedoch bisher noch nicht vollständig aufgeklärt.

1.2 Spaltarten und deren Genese

Entsprechend dem jeweiligen Zeitpunkt der Störung der Embryonalentwicklung entstehen unterschiedliche Arten und Ausprägungen einer Spalte. Dabei kann man zwischen zwei separaten Entwicklungsstörungen unterscheiden: Zum einen Spalten die den primären Gaumen betreffen – also vor dem Foramen incisivum liegen - und Spalten, die im sekundären und weichen Gaumen zu finden sind (Vgl. Abb. 6). Jede Form der Spalte kann sowohl unilateral als auch bilateral vorliegen. Anomalien im vorderen Bereich entstehen durch ein unvollständiges Verschmelzen von Oberkieferwulst und medialem Nasenwulst. Sie können als laterale Lippenspalte (Abb. 6b+f) oder als Lippen-Oberkieferspalte bzw. Spalte zwischen primärem und sekundärem Gaumen auftreten (Abb. 6c+g). Wenn sich in der späteren Entwicklung die Gaumenplatten nicht komplett vereinigen, führt dies zur isolierten hinteren Gaumenspalte (Abb. 6a+e) bzw. zu einer gespaltenen Uvula. Eine Spalte wird als Segelspalte bezeichnet, wenn nur der weiche Gaumen betroffen ist. Die Fusion der Gaumenplatten kann durch verschiedene Ursachen gestört sein, z.B. ein vermindertes Wachstum der Platten, fehlerhaftes Aufrichten oder eine ungenügende Verlagerung der Zunge (Sadler et al., 2003). Des Weiteren kann eine Kombination aus Spalten in beiden Bereichen auftreten (Abb. 6d+h), wobei die Spalten aufgrund der zeitlich unterschiedlichen Entstehungsmechanismen als zwei getrennte Anomalien angesehen werden müssen.

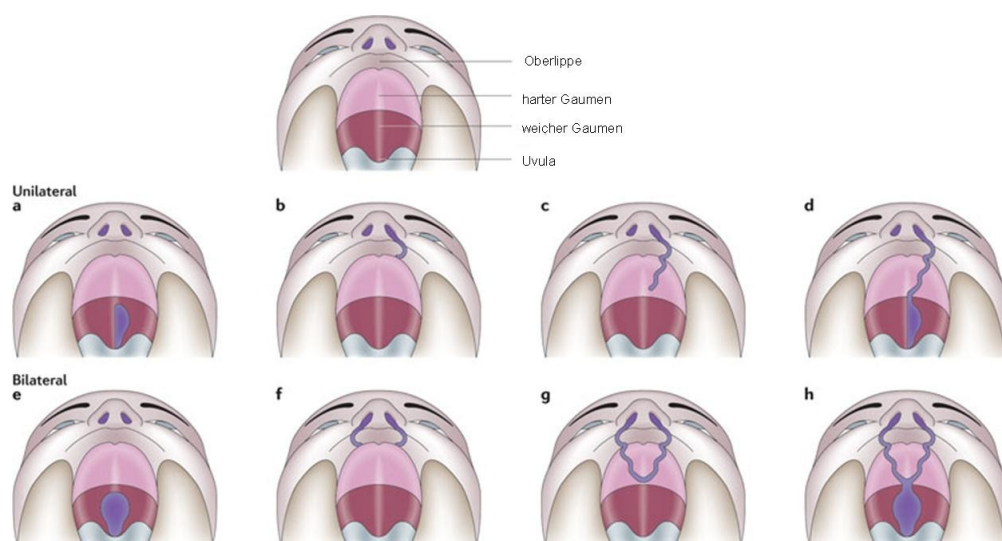


Abb.6 Spaltarten nach Dixon et al. 2011. **a** und **e** stellen reine Gaumenspalten des weichen Gaumens dar, während **b**, **c**, **d** sowie **f**, **g** und **h** die Varianten der Lippen-Kiefer- und/oder Gaumenspalten aufzeigen. Der jeweils gespaltene Bereich ist in violett dargestellt.

Neben diesen Grundformen der Spalten gibt es zahlreiche weitere Ausprägungen - von kleinen Kerben in der Oberlippe bis hin zu tiefen Lippen-Kieferspalten, die in den Nasenraum hineinreichen. Defekte des harten Gaumens bei geschlossener Mucosadecke werden als okkulte Spalten bezeichnet, welche äußerlich häufig nur schwer zu erkennen sind (Kaplan, 1975). In Fällen, in denen der Oberkieferfortsatz nicht mit den lateralen Nasenwülsten fusioniert, kommt es zur Ausbildung von schrägen Gesichtsspalten, welche von der Oberlippe bis zum Orbitarand reichen. Im Gegensatz dazu entstehen quere Gesichtsspalten, die von der Mundspalte zum Ohr ziehen, durch eine fehlende Verschmelzung von Ober- und Unterkieferfortsatz.

1.3 Ätiologie der LKGS-Spalten

Der kausale Ursprung der Spaltbildung ist sehr inhomogen und bis heute weitgehend ungeklärt. Bis zu 50% der Spalten treten in Verbindung mit weiteren Symptomen in Form eines Syndroms auf. Inzwischen sind in der OMIM-Datenbank über 500 Syndrome, die mit einer LKGS-Spalte einhergehen, beschrieben (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>). Ursächlich dafür können sowohl Chromosomopathien, wie z.B. Trisomie 13, 18 und Wolf-Hirschhorn-Syndrom sein, als auch monogene Anomalien (z.B. Van-der-Woude-Syndrom, Cornelia-de-Lange-Syndrom). Es existieren jedoch weiterhin zahlreiche Syndrome ohne bekannten genetischen Hintergrund (z.B. Kapur-Toriello-Syndrom). Auch für die meisten nicht-syndromalen LKGS-Spalten konnten bisher nur selten Genvarianten verantwortlich gemacht werden. Man nimmt inzwischen eine multifaktorielle Vererbung an, wobei eine additive Polygenie in Kombination mit verschiedenen Umweltfaktoren eine Rolle spielt. So ist bekannt, dass eine maternale Exposition gegenüber Tabakrauch (Shi et al., 2007; Yildirim et al., 2012), Alkohol (DeRoo et al., 2008) oder verschiedensten Medikamenten, wie Antiepileptika (Holmes et al., 2008) oder Kortikoiden (Carmichael & Shaw, 1999), vor allem im ersten Trimester der Schwangerschaft das Risiko einer Spaltbildung erhöhen kann. Eine aktuelle Metaanalyse von Molina-Solana et al. (2012) bestätigt den negativen Einfluss von Teratogenen, zeigt aber auch eine Möglichkeit zur Reduzierung des Spalttrisikos durch die Aufnahme von Folsäure auf.

1.3.1 Erbllicher Einfluss auf die Spaltbildung

Trotz aller schädigenden äußeren Einflüsse scheint die genetische Komponente bei der Ausbildung einer LKGS-Spalte den höchsten Stellenwert einzunehmen. Dies belegt der Nachweis familiärer und populationsabhängiger Häufungen (Brito et al., 2011). Es konnte festgestellt werden, dass sich das Wiederholungsrisiko einer Spaltbildung innerhalb einer Familie mit der Anzahl der Betroffenen und der Nähe des Verwandtschaftsgrades erhöht (Bender, 2000). So tritt bei Nachkommen spalttragender Personen, unabhängig davon welcher Elternteil betroffen ist, signifikant häufiger eine Spalte auf als bei Kindern gesunder Eltern (Sivertsen et al., 2008). Trotz der Tatsache, dass in einigen Fällen eine statistisch signifikante Assoziation zwischen häufiger vererbten Allelen und Spalten gezeigt werden konnte (z.B. bei Pletsch, 2003 für $TGF\alpha$ und Lee et al., 2012 für PAX9), wurde bisher kein eindeutiger „Parent-of-Origin“-Effekt nachgewiesen (Jugessur et al., 2010; Shi et al., 2012).

Die Zwillingsstudie von Grosen et al. (2011) verdeutlicht, dass Zwillinge an sich zwar kein erhöhtes Risiko einer Spaltbildung im Vergleich zu Einlingen aufweisen, aufgrund der großen Konkordanz zwischen den Zwillingen jedoch auf jeden Fall eine gewisse Erblichkeit vorliegt. Das Fehlen einer 100%igen Konkordanz zwischen monozygoten Zwillingen zeigt jedoch wiederum, dass genetische Veränderungen nicht die alleinige Ursache der Spaltbildung sein können. Erst das Zusammentreffen mehrerer prädisponierender Gene und weiterer Faktoren, welche auch das Geschlecht des Embryos einschließen, führen zur Störung der gesunden Lippen-, Kiefer- und Gaumenentwicklung.

1.3.2 Kandidatengene

Zahlreiche Arbeitsgruppen testeten in den letzten 20 Jahren unterschiedlichste Ansätze, um Suszeptibilitätsgene für LKGS zu finden. Kopplungsanalysen und Assoziationsanalysen stellten lange Zeit die meist verwendeten Methoden dar. Als erstes Gen, welches im Verdacht stand LKGS zu bedingen, wurde $TGF\alpha$ untersucht (Ardinger et al., 1989). Es folgten zahlreiche (Tier-)Studien zur Auswirkung genetischer Veränderungen in Genen, die in Zellproliferation, Differenzierung und Synthese während der Lippen- bzw. Gaumenentwicklung involviert sind bzw. deren Expression in den entsprechenden Phasen der Embryogenese erhöht ist, so z.B.

TGF α und TGF β (Fitzpatrick et al., 1990; Lee et al., 1985). Weiterhin wurden Gene, deren Veränderung bei Tieren zur Spaltbildung führen, auf einen humanen Einfluss geprüft. So wurde z.B. auch das in der vorliegenden Arbeit untersuchte FOXF2 anhand eines kleinen Patientenkollektivs von Jochumsen et al. (2008) untersucht, nachdem an Knockout-Mäusen stets eine Spaltbildung diagnostiziert wurde (Wang et al., 2003). Außerdem wurde auf Gene fokussiert, die bei metabolischen Vorgängen von Risikosubstanzen von Bedeutung sind (z.B. MTHFR (Methylentetrahydrofolat-Reduktase) im Folat-Stoffwechsel (Shaw et al., 1998)). Für die Mehrheit der untersuchten Gene finden sich gegenteilige Studien: Zum einen Arbeiten, die eine Assoziation belegen, zum anderen Analysen, die einen Zusammenhang widerlegen. Einzig für das Gen IRF6 (Interferon-regulierender Faktor 6, ein Transkriptionsfaktor) konnte eine konsistente Assoziation nachgewiesen werden (Zuccherro et al., 2004). Dabei ist eine ursächliche Wirkung von Mutationen im IRF6-Gen vor allem für das Van-der-Woude-Syndrom beschrieben (Kondo et al., 2002). Dies ist durch zusätzliche Grübchen in der Unterlippe und Hypodontie gekennzeichnet. Aufgrund der Variabilität des Krankheitsbildes kann jedoch die Spalte auch das einzige Symptom darstellen (Lam et al., 2010), so dass das Syndrom nicht sofort als solches zu erkennen und die Abgrenzung zur nicht syndromalen Spalte problematisch ist.

Durch die Entwicklung neuer Hochdurchsatz-Genotypisierungstechniken (zum Beispiel der Illumina BeadChip Technologie) und genomweiter Assoziationsanalysen erweiterte sich die ohnehin schon lange Liste der potenziellen Kandidatengene (vgl. z.B. Jugessur et al., 2009; Murray, 2002). Inzwischen erbrachten vier große genomweite Studien zwei besonders viel versprechende chromosomale Kandidatenregionen (8q24 und 10q25) sowie erneut eine Bestätigung der Assoziation von LKGS zum Gen IRF6 (Beaty et al., 2010; Birnbaum et al., 2009; Grant et al., 2009; Mangold et al., 2010).

Da bereits mehrfach festgestellt werden konnte, dass eine Assoziation zwischen Genen und Spaltbildung populationsabhängig sein kann, sollen in der vorliegenden Studie auch bereits bekannte Polymorphismen der Gene TGF α und TGF β 3 an einem rein (mittel-)deutschen Kollektiv untersucht werden.

1.3.2.1 Genfamilie der Transforming Growth Factors (TGF)

Bei den Transforming Growth Factors handelt es sich um Moleküle der Zytokin-Klasse, das heißt Proteine, welche spezifisch an Rezeptoren binden und dadurch

unterschiedliche Einflüsse auf Wachstum, Entwicklung und Differenzierung von Zellen haben. Man unterscheidet hierbei zwischen Wachstumsfaktoren der TGF α - und TGF β -Superfamilien, die jedoch weder strukturell noch funktionell miteinander verwandt sind. Vor allem die TGF β -Superfamilie stellt mit über 50 Mitgliedern, darunter Bone morphogenic Proteins (BMPs) und Activin/Inhibin, eine sehr umfangreiche Zytokin-Gruppe dar (Bottner et al., 2000).

1.3.2.1.1 Kandidatengen TGF α

Das TGF α -Gen ist auf dem Chromosom 2p13 lokalisiert und besteht aus 6 Exons und 5 Introns (Machida et al., 1999). Es codiert für ein 160 Aminosäuren langes, transmembranes Glycopeptid (Derynck et al., 1984), welches eine 40%-ige Homologie zum Epidermal Growth Factor (EGF) aufweist und deshalb auch als EGF-like TGF bezeichnet wird (Derynck, 1986). Die extrazelluläre Region des TGF α umfasst drei Schleifen, welche durch Disulfidbrücken gebildet werden. Sie kann als 50 Aminosäuren großes Spaltprodukt vom Protein getrennt werden (Pike et al., 1982). Die intrazelluläre Interaktion des TGF α erfolgt über eine Bindung dieser Schleifen an den membranständigen EGF-Rezeptor (Todaro et al., 1980). Die dadurch bedingte Aktivierung der Tyrosin-Kinase löst die Ras-Raf-MAP-Kinase-Kaskade aus und resultiert in einer Phosphorylierung intrazellulärer Zielproteine.

TGF α wirkt als Entwicklungswachstumsfaktor und wird vor allem während der embryonalen Zellentwicklung exprimiert. In Tierversuchen konnte bereits von Lee et al. (1985) gezeigt werden, dass Tgfa in sehr frühen Embryonalstadien ein besonders hohes Expressionslevel erreicht, welches noch vor der Geburt wieder absinkt. Es wurde bewiesen, dass es an zahlreichen Entwicklungsschritten unterschiedlicher Gewebe beteiligt ist, wie z.B. der Zellmigration von Keratinozyten (Barrandon & Green, 1987), der Entstehung von Haarfollikeln und funktionsgerechter Augen (Luetteke et al., 1993), der Proliferation pulmonaler Epithelialzellen (Ryan et al., 1994), der Erneuerung von epithelialen Zellen des Dickdarms (Cameron & Hardman, 2002) sowie der Genese der einzelnen Nierenkompartimente (Carev et al., 2008).

Auch in der Zahn-, Kiefer-, und Gaumenentwicklung kommt dem TGF α eine entscheidende Bedeutung zu. Dixon et al. (1991) wiesen eine erhöhte Tgfa-Expression in den Zahnanlagen nach. Callahan et al. (2009) konnten zeigen, dass signifikante Veränderungen im TGF α existieren, welche zu Zahnagenesie führen

können. Ebenso ergaben sich frühzeitig direkte Anhaltspunkte für eine Verbindung zwischen TGF α und dem Auftreten von LKGS (Ferguson, 1987).

Anhand von Tierversuchen wurde die Expression von Tgfa während der Kiefer- und Gaumenbildung studiert und eine proliferative Wirkung auf das Gaumengewebe beobachtet (Dixon et al., 1991; Iamaroon et al., 1996). Dixon et al. verfolgten dabei an kultiviertem Gaumengewebe der Maus die Expression vom 12. bis zum 15. Tag der Embryonalentwicklung. Dabei zeigt sich anfangs eine erhöhte Tgfa-Expression im gesamten Mesenchym, während im epithelialen Bereich nur eine geringe Tgfa-Konzentration nachweisbar ist. Später verlagert sich die hohe Expressionsmenge des Tgfa in das Epithel und die Spitze des palatalen Mesenchyms. Am Tag 14.5, der Phase der Fusion der Gaumenplatten, ist die Tgfa-Konzentration im Mittellinienepithel und dem darunter befindlichen Mesenchym am ausgeprägtesten. Am Tag 15 der Embryonalentwicklung, also nach der Fusion des Gaumens, tritt eine generalisierte Expression des Tgfa im Epithel auf, wobei im verbleibenden Rest des Mittellinienepithelsaumes (MES) noch eine erhöhte Tgfa-Konzentration messbar ist. Dies weist auf die regulierende Funktion des Tgfa während der Degeneration des Epithelsaumes hin. In weiteren Tierversuchen wurde durch Luetkeke et al. (1993) gezeigt, dass Tgfa-Knockout-Mäuse keine Gaumenspalte entwickeln. Deshalb wird von einer so genannten „Modifier“-Funktion des Gens ausgegangen.

Aufgrund dieser Erkenntnisse über den Einfluss von Tgfa auf die Gaumenbildung bei Mäusen wurde in mehreren Studien nach Veränderungen im humanen Pendant des Gens bei LKGS-Patienten gesucht. Dabei wurden verschiedene Polymorphismen und Mutationen beobachtet und auf ihre Signifikanz in Bezug auf die Entstehung von LK \pm GS geprüft. Weiterhin konnte die Arbeitsgruppe um Rullo et al. (2007) eine verminderte TGF α -Proteinexpression in Gewebe von Spaltpatienten im Vergleich zu Kontrollgewebe nachweisen.

Die ersten Resultate über eine Assoziation zwischen Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen und LK \pm GS an einem Patientenkollektiv der USA wurden von Ardinger et al. (1989) veröffentlicht. Darauf folgende Studien, unter anderem von Sassani et al. (1993) und Feng et al. (1994), bestätigten in anderen Populationen eine Assoziation zwischen einer 4bp-Deletion im 5. Intron des Gens. Es wurde weiterhin vermutet, dass dieser Polymorphismus in Kombination mit dem Einfluss von Tabak oder Alkohol während der Schwangerschaft eine prädisponierende Wirkung besitzt. Shaw et al. (1996) untersuchten hierfür ein großes kalifornisches

Kollektiv von 678 Patienten und 829 Kontrollen. Sie konnten ein allgemein gesteigertes Spaltrisiko bei maternalem Tabakkonsum nachweisen, aber auch eine Assoziation des $\Delta 4\text{bp}$ -Allels, der Rauchexposition und der Entstehung von LKGS, wenn die Mütter während der Schwangerschaft mehr als 20 Zigaretten pro Tag rauchten. Auch eine Metaanalyse zu diesem Thema von Zeiger et al. (2005) belegte die schädliche Wirkung des Tabaks. Eine Assoziation mit dem $\Delta 4\text{bp}$ -Allel konnte jedoch nur für isolierte Gaumenspalten festgestellt werden. Souza et al. (2012) konnten anhand einer familienbasierten Assoziationsstudie mit 175 brasilianischen Trios kein erhöhtes Risiko bei Tabak-/Alkohol-Konsum der Mutter in Verbindung mit dem seltenen Allel $\Delta 4\text{bp}$ zur Spaltbildung nachweisen.

Als weitere potenzielle Kandidatenregion wird der Mikrosatellit D2S443 angesehen, welcher in unmittelbarer Nähe zum $\text{TGF}\alpha$ -Gen gelegen ist. So formulierten Maestri et al. (1997) und Suazo et al. (2005) eine mögliche Kopplung bzw. Assoziation von bestimmten Allelen dieses Locus zu $\text{LK}\pm\text{GS}$. Jedoch erschienen auch Studien, in welchen für beide Polymorphismen keine eindeutige Assoziation nachgewiesen werden konnte (Hecht et al., 1991; Passos-Bueno et al., 2004; Suazo et al., 2005; Zhu et al., 2010) bzw. der Modifier-Status unterstützt wurde (Vieira, 2006). Angesichts dieser heterogenen Ergebnisse sind beide Loci Gegenstand der Untersuchung in der vorliegenden Arbeit.

1.3.2.1.2 Kandidatengen $\text{TGF}\beta 3$

Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte $\text{TGF}\beta 3$ gehört zur $\text{TGF}\beta$ -Superfamilie und ist neben $\text{TGF}\beta 1$ und $\text{TGF}\beta 2$ eine von drei hochkonservierten Isoformen. Sie werden genetisch verschieden codiert und besitzen unterschiedliche Funktionen als Signalpeptide, wobei sie in zahlreichen Geweben an der Regulation von Proliferation und Zelldifferenzierung beteiligt sind. Auch $\text{TGF}\beta 4$ (auch *ebaf*, *LEFTY2*) ist ein Mitglied dieser Superfamilie, welches einige Homologien und strukturelle Ähnlichkeiten zu $\text{TGF}\beta 1-3$ aufweist. Es ist jedoch in der Funktion recht spezifisch auf endometriale Vorgänge, rechts-links Achsenbildung während der Embryonalentwicklung und die Regulation der Embryoimplantation beschränkt (z.B. Kosaki et al., 1999; Kothapalli et al., 1997; Tabibzadeh, 2002; Tabibzadeh et al., 1998; Tang et al., 2005).

Das Kandidatengen TGFβ3 ist auf Chromosom 14q24 lokalisiert und setzt sich aus 7 Exons zusammen (Derynck et al., 1988). TGFβ-Proteine werden als Precursor-Moleküle mit einer amino-terminalen Signalsequenz und einer in der Größe variierenden Pro-Domain synthetisiert. Die Signalsequenz führt das Precursor-Molekül dem sekretorischen Pathway zu, während die Pro-Domain der korrekten Faltung, der Dimerisierung von Untereinheiten und Regulation der Faktor-Aktivität dient (Kingsley, 1994). Nach Abspaltung der Pro-Domain an einem spezifischen RXXR-Motiv werden carboxy-terminale Fragmente von 110 bis 140 Aminosäuren frei, welche Homo- oder Heterodimere bilden und so das biologisch aktive Protein darstellen (Bottner et al., 2000).

Ihre Zytokin-Aktivität können TGFβs über unterschiedliche Signaltransduktionswege ausführen, wobei der SMAD-Pathway den Standardweg darstellt. Dabei bindet ein TGFβ-Dimer an einen membranständigen Typ II Rezeptor, worauf eine Rekrutierung und Phosphorylierung eines Typ I Rezeptors (Alk-5) folgt. Beide Rezeptoren zählen zur Gruppe der Serin/Threonin-Rezeptor-Kinasen. Der Rezeptor-Komplex kann wiederum mittels eines so genannten Linker-Proteins (SARA) R-SMAD-Proteine (Rezeptor regulierte SMADs) rekrutieren, phosphorylieren und dadurch aktivieren. Diese lösen sich daraufhin vom Rezeptor und tragen das Signal vom Cytoplasma in den Zellkern und steuern so die Transkription verschiedenster Gene. Hierbei stellen SMAD2 und SMAD3 die Hauptmediatoren dar, welche mit einem Co-SMAD (primär SMAD4) ein Trimer bilden. SMAD6 und SMAD7 (I-SMADs) können inhibierend auf die Aktivität von R-SMADs wirken (Chang et al., 2002). Abgesehen vom SMAD-Pathway ist bekannt, dass TGFβ3 auch alternative Transduktionswege induzieren kann, so z.B. über die Kinasen p38 MAPK (mitogen-aktivierte Proteinkinase) und TAK1 (TGFβ aktivierte Kinase 1) (Cohen, 2003; Dudas et al., 2004).

Die TGFβ-Zytokine stellen multifunktionale Faktoren dar, die unter anderem an der Proliferation, Differenzierung, Adhäsion, Migration von Zellen, Apoptose und extrazellulären Matrix-Synthese beteiligt sind. TGFβ3 spielt eine besondere Rolle bei der Embryonalentwicklung und Zellproliferation. So stimuliert und reguliert es die Collagensynthese in humanem Gewebe (Murata et al., 1997). Außerdem ist eine Überexpression des Proteins vielfach Teil des proliferativen Geschehens im Rahmen der Tumorgenese unterschiedlicher Krebsarten (z.B. Kloen et al., 1997). Es wird jedoch auch ein suppressiver Effekt von TGFβ3 bzw. der TGFβ3-Überexpression auf ein Tumorwachstum diskutiert (Lavery et al., 2009; Schniewind et al., 2006). Ein

verändertes TGF β 3-Protein kann wiederum Krankheiten wie Kardiomyopathie hervorrufen (Beffagna et al., 2005).

Bereits 1990 konnte von mehreren Arbeitsgruppen an Mäusen gezeigt werden, dass sich vor der Fusion eine starke TGF β 3-Expression in den Spitzen der Gaumenplatten (im Epithel der medialen Kante) findet (Fitzpatrick et al., 1990; Pelton et al., 1990). Bei TGF β 3-Nullmutanten Mäusen erfolgt ein normales Wachstum, Anheben und Annähern der Gaumenplatten, jedoch bleibt die Verschmelzung aus und eine Spalte entsteht (Kaartinen et al., 1995; Proetzel et al., 1995). In diesem Zusammenhang muss die Induktion der Expression des Chondroitinsulfat-Proteoglykans (CSPG) durch TGF β 3 betrachtet werden, welche Gato et al. (2002) nachweisen konnten. Dieses CSPG ist essentiell für die Adhäsion der Gaumenfortsätze und wird unmittelbar vor dem in Kontakt treten dieser auf der Oberfläche des MEE exprimiert. Somit bewirkt ein herunterreguliertes oder fehlendes Tgf β 3 auch ein Defizit an CSPG, was im Experiment in muriner (bei der Maus) Spaltenbildung resultiert. Bezeichnend dafür sind auch die Beobachtungen der gleichen Studie von Gato et al. sowie von Sun et al. (1998) bei Vögeln, welche normalerweise eine physiologische Gaumenspalte und keine TGF β 3-Expression in der Embryonalphase aufweisen. Hier führte die Zugabe von TGF β 3 zu Gaumenpräparaten gleichfalls zu einer Fusion der Fortsätze.

An humanen Gewebeproben konnte gezeigt werden, dass die Proliferation der Mesenchymzellen der Gaumenplatten durch die TGF β 3-induzierte Expression des Transkriptionsfaktors c-Myc gefördert wird (Zhu et al., 2012). Weitere in vivo Experimente an primären Zellkulturen von MES-Zellen kamen hingegen zu dem Ergebnis, dass die unmittelbare Auswirkung des TGF β 3 ein Arrest des Zellzyklus ist, welcher für den Untergang des MEE zwingend notwendig ist (Ahmed et al., 2007). Dies wird durch die tierexperimentellen Ergebnisse von Knight et al. 2006 bestätigt, wonach in Tgf β 3-knock out Mäusen keine Apoptose der MEE-Zellen stattfindet, was auf eine TGF β 3-abhängige Herunterregulierung von IRF6 zurückgeführt wird. Des Weiteren konnte ein Einfluss von TGF β 3 auf die Transdifferenzierung des MEE-Gewebes und die Migration der Zellen bewiesen werden, was gleichzeitig die Beteiligung dieses Mechanismus' an der Auflösung des MES bestätigt (Iordanskaia & Nawshad, 2011; Nogai et al., 2008). Dudas et al. konnten 2004 und 2006 zeigen, dass die Induktion der Fusion der Gaumenplatten bzw. die Auflösung des MES

während der Embryonalentwicklung durch TGF β 3 hauptsächlich über den Alk-5/SMAD Pathway erfolgt. Jedoch wird auch dem PI-3-Kinase-Weg, vor allem für die epithelio-mesenchymale Transdifferenzierung, eine entscheidende Bedeutung zugemessen (Kang & Svoboda, 2002; San Miguel et al., 2011). Als weiteres wichtiges TGF β 3-abhängiges Signalmolekül wird Sonic hedgehog (SHH) angesehen, dessen Expression in Tgf β 3 Nullmutanten Mäusen stark reduziert ist, wobei ein Fehlen des SHH mit Gesichtsfehlbildungen mit Spaltbildung einhergeht (Sasaki et al., 2007).

Diese Beobachtungen zur bedeutenden Rolle des TGF β 3 in unterschiedlichen Phasen der Gaumenentwicklung im Tierexperiment veranlassten zahlreiche Arbeitsgruppen zur Untersuchung des humanen TGF β 3-Gens bei Spaltpatienten. Außerdem wurde in einer genomweiten Meta-Analyse eine signifikante Koppelung zwischen TGF β 3 und LKGS bestätigt (Marazita et al., 2004).

Lidral et al. wiesen 1998 in einer kaukasischen Population durch einen Transmissions Disequilibrium-Test eine Assoziation zwischen zwei Sequenzvarianten im TGF β 3-Gen zu LKGS nach, jedoch nicht zu isolierten Gaumenspalten. Bei diesen Varianten handelt es sich um eine 6bp Deletion im Promotorbereich und eine Substitution von T \rightarrow C im Intron 4 des Genes. In einer Fall-Kontroll-Studie am gleichen Kollektiv konnten diese Ergebnisse allerdings nicht bestätigt werden. Entgegen den Ergebnissen von Lidral et al. stellten Vieira et al. (2003) eine signifikante Verbindung des Deletionspolymorphismus' zu isolierten Gaumenspalten in ihrer südamerikanischen Population fest. Weiterhin konnte an einem anderen (US-)Kollektiv eine gesteigerte Spaltanfälligkeit bei Kindern mit homozygoten Wildtypallelen unter maternaler Rauchexposition von ≥ 10 Zigaretten pro Tag bzw. ≥ 4 alkoholischen Getränken pro Monat festgestellt werden, eine Assoziation zum jeweils seltenen Allel ergab sich nicht (Romitti et al., 1999).

Beide Kandidatengenregionen werden in der vorliegenden Arbeit auf ihre Signifikanz in Bezug auf LKGS eines mitteldeutschen Kollektivs untersucht.

1.3.2.2 *Forkhead-Box-Proteine*

Forkhead-Box-Proteine, im Folgenden kurz FOX genannt, stellen eine Gruppe eukaryoter Transkriptionsfaktoren dar, welche bedeutende Rollen bei der embryonalen Entwicklung übernehmen. Allen gemein ist eine spezifische, konservierte, ca. 110 Aminosäuren lange DNA-Bindedomäne vom Helix-Turn-Helix

Typ – die Forkhead-Box. Aufgrund der besonderen Struktur aus drei α -Helices und zwei Loops, welche an eine Schmetterlingsform erinnern, wird diese Domäne auch als „winged helix DNA-binding domain“ bezeichnet (Clark et al., 1993). Der Name FOX leitet sich von einer gabelförmigen Umbildung des Kopfes bei Drosophila-Mutanten ohne forkhead-Gen ab (Weigel et al., 1989). Mittlerweile wurden mehrere Unterklassen von FOXA bis FOXS, in Spezies von Hefe bis Mensch, identifiziert (Liste der orthologen FOX-Gene: <http://biology.pomona.edu/fox/foxbyclass.html>).

FOX-Proteine binden als Monomere über die dritte α -Helix der Forkhead-Box an die DNA, genauer an ein RYMAAYA-Targetmotiv, um dort sowohl als Aktivatoren als auch als Repressoren zu agieren. Die die Targetsequenz flankierende Basensequenz ist jedoch entscheidend für die Spezifität der FOX/DNA-Interaktion (Cirillo & Zaret, 2007). Während die DNA-Bindungsdomäne zwischen den verschiedenen FOX-Proteinen stets sehr ähnlich ist, treten starke Unterschiede in der Struktur der Aktivierungs- bzw. Repressionsdomänen auf (Pierrou et al., 1994).

FOX-Proteine wirken über unterschiedliche Signaltransduktionswege auf die Transkription ihrer Target-Gene ein. So aktiviert FOXH1 zum Beispiel zusammen mit SMAD-Proteinen die Mesodermentwicklung, ähnlich dem TGF β -Signaltransduktionsweg. Proteine der FOXO-Gruppe regulieren die Zielgen-transkription hingegen über den PI-3 Kinase/PDK1/PKB Weg (Carlsson & Mahlapuu, 2002).

Während der Phase der Embryonalentwicklung sind die FOX-Proteine in zahlreichen Prozessen in unterschiedlichen Geweben aus allen drei Keimblättern involviert. Demzufolge wirken sich Veränderungen in der Gen-Struktur auch auf den Phänotyp der Organismen aus. So ist zum Beispiel beim Menschen in Fällen des Axenfeld-Rieger Syndroms eine Veränderung des FOXC1-Gens zu finden und Mutationen im FOXP2-Gen können zu Sprachbehinderungen führen (Lehmann et al., 2003). Auch eine Assoziation des FOX-Proteins FOXE1 zur Ausbildung von LKGS konnte bereits bestätigt werden (Moreno et al., 2009; Nikopensius et al., 2011).

1.3.2.2.1 Kandidatengen FOXF2

Das FOXF2-Gen (Synonyme: FKHL6, Forkhead box f2, Forkhead-related transcription factor 2, FREAC2, murin: LUN) befindet sich auf dem kurzen Arm des 6. Chromosoms und liegt innerhalb eines FOX-Clusters zwischen FOXQ1 und FOXC1 (Wotton & Shimeld, 2011). Es setzt sich aus zwei Exons zusammen, welche durch

ein Intron in 3'-Position zur Forkhead box getrennt werden (Vgl. Abb.7). Zudem codiert das erste Exon für eine der beiden Aktivierungsdomänen (AD2), während die Sequenz des zweiten Exons die c-terminale Aktivierungsdomäne 1 (AD1) verschlüsselt. Die Forkhead Domäne trägt neben der DNA-Bindungssequenz gleichzeitig die Kernlokalisierungssequenz (NLS) und ist auf Proteinebene für die Interaktion mit TATA-Box-bindenden Proteinen (TBP) verantwortlich. Rund um den Transkriptionsstartpunkt vor dem ersten Exon, wie auch am 5' Ende des Gens, befindet sich eine GC-Insel mit stark erhöhtem GC-Gehalt. Das komplette exprimierte FOXF2-Protein ist 444 Aminosäuren lang (Blixt et al., 1998; Hellqvist et al., 1998).

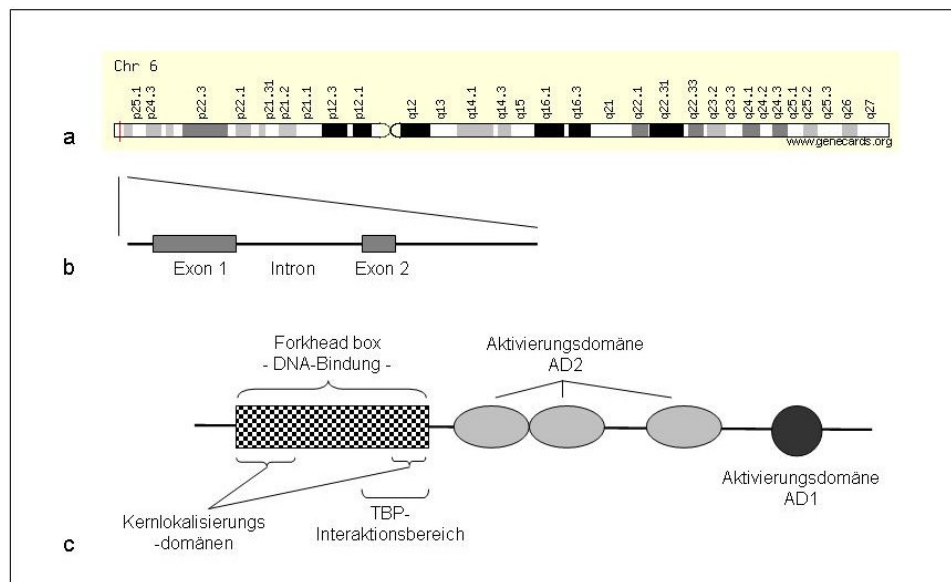


Abb. 7 Lokalisation und schematischer Aufbau des FOXF2-Gens und -Proteins. a) chromosomale Lage des Gens auf Chromosom 6p25.3; b) schematische Darstellung der Gen-Komponenten; c) schematische Darstellung der funktionellen Proteindomänen (modifiziert nach Hellqvist et al. 1998).

Vorwiegend wird FOXF2 in der Lunge und Plazenta exprimiert, aber auch in Prostata, Colon und fetalem Hirn (Pierrou et al., 1994). Durch weitere Studien an Mäusen konnte gezeigt werden, dass es ebenso im zentralen Nervensystem, dem Innenohr und Gliedmaßen exprimiert wird (Aitola et al., 2000; Wang et al., 2003). Die höchste Konzentration an FOXF2 mRNA konnte im Mausembryo jedoch im Mesenchym um den Oropharynx, der Zahnanlage, dem sich entwickelnden Gaumen und der Zunge festgestellt werden (Aitola et al., 2000; Ormestad et al., 2004; Wang et al., 2003). Hinsichtlich einer möglichen Funktion während der Gaumenentwicklung konnten Wang et al. bereits 2003 feststellen, dass *Foxf2*-Nullmutanten ausnahmslos

Spalten des sekundären Gaumens aufweisen und zeigten somit, dass *Foxf2*, zumindest bei Mäusen, einen wichtigen Entwicklungsregulator während der Palatogenese darstellt. Es wird angenommen, dass sich die Zunge nicht in ausreichendem Maße senkt und somit ein Aufeinanderzubewegen der Gaumenplatten schon mechanisch verhindert wird.

Der genaue Signaltransduktionsweg während der Gaumenentwicklung ist nicht geklärt. Bekannt ist aber, dass die mesenchymale *Foxf2*-Expression selbst durch die *Shh*-*Smo*-Signalkaskade positiv reguliert wird (Lan & Jiang, 2009). Dadurch wird *FOXF2* zum terminalen Transkriptionseffektor des Hedgehog-Pathways. Es konnten bereits Zielgene des *Shh*-aktivierten *Foxf2* während der Darmentwicklung identifiziert werden. So hat es unter anderem die Funktion der Kontrolle mesenchymaler Proteine wie *Bmp* und *Wnt5a* und Aktivierung der Produktion von extrazellulärer Matrix (Ormestad et al., 2006). Dabei ist hervorzuheben, dass *Wnt5a* wiederum auch in der Gaumenentwicklung eine entscheidende Rolle spielt (He et al., 2008).

Weiterhin wird eine Beteiligung an der Regulierung der epitelio-mesenchymalen Transdifferenzierung in Prostatagewebe vermutet (van der Heul-Nieuwenhuijsen et al., 2009), was die Annahme erweckt, dass dies auch bei der EMT während der Gaumenentwicklung der Fall sein kann. Es konnte außerdem eine Steigerung der *Foxf2*-DNA-Bindungsaktivität in murinem Lungengewebe nach Zigarettenrauch-Exposition festgestellt werden (Tharappel et al., 2010). Dies stellt eine eindeutige Gen-Umwelt-Interaktion zwischen einem Kandidatengen und einem LKGS-Risikofaktor dar.

1.4 Assoziations- und Fall-Kontrollstudien

Genetische Studien, z.B. anhand von Tierexperimenten oder Kopplungsanalysen, geben häufig Hinweise auf eine Verbindung bestimmter chromosomaler Regionen oder genetischer Varianten zur Entstehung von Krankheiten. So können die kausalen Zusammenhänge von Fehlbildungen die direkt auf ein einzelnes Gen (bzw. auf eine Mutation in einem bestimmten Gen) zurückzuführen sind, recht zügig aufgedeckt werden. Bei komplexen, nicht-mendelnden Erkrankungen, wie der LKGS, gestaltet sich die Identifizierung von verantwortlichen Genen und Prädispositionsfaktoren häufig als sehr schwierig. Mehrere genetische Veränderungen können (zum Teil auch in Kombination) den gleichen Phänotyp bedingen, wobei sich die Effekte

verschiedener Gene summieren (additive Polygenie). Außerdem können die Gene durch andere Genorte (Epistase) oder Umweltfaktoren beeinflusst werden.

Um gehäuft bei Patienten der untersuchten Krankheit auftretende Veränderungen nachzuweisen, bedient man sich der Assoziationsanalyse. Dabei ist ein Allel mit einer Krankheit assoziiert, wenn es statistisch häufiger (oder weniger häufig) bei Betroffenen der Krankheit festgestellt wird, als in einer Kontrollgruppe bzw. als es in der Bevölkerung zu erwarten wäre. Es ist jedoch zu bedenken, dass eine statistisch berechnete Assoziation eines bestimmten Locus' kein eindeutiger Nachweis eines kausalen Zusammenhanges darstellt, sondern nur eine Tendenz zweier Merkmale (hier Ausprägung einer LKGS und ein bestimmter Genotyp) gemeinsam aufzutreten. Natürlich kann das untersuchte Allel direkt eine Anfälligkeit für die Erkrankung hervorrufen, der Marker kann aber auch durch Kopplung mit dem eigentlichen Krankheitslocus verbunden sein. Ein assoziierter Marker kann die Erkrankungswahrscheinlichkeit erhöhen. Häufig ist das Allel allein jedoch weder notwendig noch ausreichend um die Krankheit auszulösen. So kann eine genetische Variante, die tatsächlich ein prädisponierendes Allel darstellt, durchaus in Kontrollpersonen vorkommen oder bei Betroffenen fehlen (Strachan & Read, 2005).

Sofern die Kontrollprobanden sorgfältig ausgewählt werden, aus der gleichen Population stammen und vergleichbaren Umweltbedingungen (z.B. Konsum von Alkohol oder Tabak während der Schwangerschaft) ausgesetzt waren, können Assoziationsstudien einen entscheidenden Beitrag zur Aufklärung genetischer Einflüsse auf die Krankheitsentstehung des Menschen liefern.

Um Verschiebungen der Ergebnisse zum Beispiel aufgrund von Populationsvermischungen innerhalb der Kontrollgruppe zu verhindern, kann weiterhin der sogenannte Transmission-Disequilibrium-Test (TDT) angewendet werden. Hierbei werden jeweils zusätzlich zum betroffenen Kind dessen Eltern mit genotypisiert; als Kontrollen dienen die nicht-transmittierten Allele.

2 Ziele der vorliegenden Arbeit

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, anhand einer Patienten-Kontroll-Studie eine mögliche Korrelation von Mutationen und Polymorphismen mit dem Auftreten von LKGS-Spalten zu untersuchen. Dazu werden die Gene $TGF\alpha$, $TGF\beta 3$ und $FOXF2$ bzw. deren nächste Umgebung analysiert.

Es sollen bereits bekannte Längenpolymorphismen im Bereich der Gene $TGF\alpha$ und $TGF\beta 3$ auf ihre Häufigkeit bei Patienten mit LKGS-Spalten untersucht werden, indem eine Multiplex-Analyse etabliert wird. Ein weiterer Substitutionspolymorphismus im $TGF\beta 3$ -Gen soll mittels Sequenzierung analysiert werden. Bisher wurden diese Polymorphismen vorwiegend an internationalen Populationen untersucht. Da die Frequenzen von genetischen Varianten populationsabhängig sein können, soll in einem mitteldeutschen Kollektiv eruiert werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Spaltbildung und genetischen Veränderungen vorliegt.

Des Weiteren soll der komplette codierende Bereich sowie Intron/Exon-Übergänge des $FOXF2$ -Gens sequenziert werden, um Mutationen und Polymorphismen aufzudecken, die möglicherweise eine Rolle bei der Genese der LKGS-Spalten spielen können. Im Zuge dessen soll eine adäquate Methode zur Amplifikation dieser sehr GC-reichen DNA-Abschnitte entwickelt werden.

Es gilt folgende Fragestellungen zu klären:

- Findet sich eine statistisch signifikante Anhäufung von einzelnen Mutationen/Polymorphismen oder deren Kombination, bzw. finden sich Unterschiede in der Allelverteilung innerhalb des Patientenkollektivs im Vergleich zum Kontrollkollektiv?
- Kann eine Korrelation von bestimmten Mutationen/Polymorphismen zu bestimmten Untergruppen der Patienten (Geschlecht, Spaltentyp etc.) beobachtet werden?
- Finden sich im Untersuchungskollektiv individuelle, bisher nicht beschriebene, Mutationen/Polymorphismen innerhalb der zu analysierenden Bereiche?
- Kann ein hereditärer Einfluss innerhalb der Familien-Trios festgestellt werden?
- Treten vergleichbare Frequenzen der genetischen Varianten zu internationalen Studien auf oder gibt es Differenzen im untersuchten mitteldeutschen Kollektiv?

3 Methodik

3.1 Patienten- und Kontrollkollektiv

In der vorliegenden Studie wurden 75 (36 weibliche und 39 männliche) Träger einer nichtsyndrom-assoziierten Spalte sowie 105 (51 weibliche und 54 männliche) Kontrollpersonen ohne familiäre Spaltanamnese untersucht. Die Probanden beider Untersuchungsgruppen sind untereinander nicht verwandt. Für 10 Spaltpatienten stand zusätzlich Untersuchungsmaterial von beiden Elternteilen zur Verfügung, wobei, bis auf eine Mutter, die Eltern selbst keine Spaltbildung aufwiesen. Bei den Patienten wurde zwischen einseitiger und beidseitiger Lippen-Kiefer-(Gaumen)-Spalte und isolierter Gaumen- bzw. Lippenspalte unterschieden. Syndromassoziierte Spalten wurden nicht in die Untersuchung einbezogen.

Die Spaltträger sind allesamt Patienten der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie/Plastische Chirurgie des Universitätsklinikums der Friedrich Schiller-Universität Jena. Die Materialentnahme und Anamnese erfolgte während der Spaltträgersprechstunde durch den jeweils behandelnden Arzt. Des Weiteren wurden zeitgleich alle Beteiligten bzw. deren Eltern über die Studie informiert und deren Einwilligung eingeholt. Auf Befragung erklärten alle Mütter, während der Schwangerschaft weder Alkohol noch Nikotin konsumiert zu haben oder anderen schädlichen Risikofaktoren ausgesetzt gewesen zu sein.

Das Kontrollkollektiv setzt sich aus gesunden Patienten der Klinik für Kieferorthopädie sowie Mitarbeitern des Instituts für Rechtsmedizin der FSU Jena und deren Angehörigen zusammen. Alle Probenentnahmen erfolgten anonym, nur unter Mitteilung des Geschlechts sowie ggf. der vorliegenden Spaltart der Probanden bzw. deren Verwandtschaftsverhältnisse. Alle Patienten und Kontrollen gehören der mitteldeutschen Population an.

3.2 Experimentelle Methoden

3.2.1 DNA-Isolation aus Mundschleimhautabrieben

Von jedem Probanden wurden 1 bis 4 Mundschleimhautabstriche angefertigt und getrocknet. Die DNA-Extraktion erfolgte mittels Invisorb® Spin Swab Kit (Fa. Invitex)

bzw. über eine automatisierte Extraktion mithilfe des BioRobot EZ1 (Fa. Qiagen) nach Herstellerangaben.

3.2.2 DNA-Isolation aus Blut

In 11 Fällen wurden ca. 7 ml EDTA-Blut entnommen. Bis zum Zeitpunkt der DNA-Extraktion wurde dieses bei -20°C gelagert. Die Extraktion erfolgte über das QIAamp DNA Blood Mini Kit (Fa. Qiagen) nach Herstellerangaben.

3.2.3 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Quantifizierung der DNA erfolgte über eine Real-Time PCR mittels Applied Biosystems Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit. Dazu wurden jeweils 2 µl der extrahierten DNA für die Konzentrationsmessung in Doppelbestimmung eingesetzt und auf einem Rotor-Gene 3000 bzw. Rotor-Gene® Q Gerät vermessen.

3.2.4 PCR-Amplifikation

3.2.4.1 *Multiplex PCR zur Genotypisierung der Polymorphismen TGFα-Δ4bp, TGFα-D2S443 und TGFβ3-Δ6bp*

Das Gen TGFα ist auf dem Chromosom 2p13 lokalisiert. Der untersuchte 4bp-Deletionspolymorphismus befindet sich innerhalb des Intron 5, wobei die Wildtypvariante des PCR-Produktes eine Fragmentgröße von 117 bp aufweist, die des deletierten Allels 113bp (Deletion der Basen „TAAT“). Aufgrund der durch die 4bp-Deletion entstehenden Restriktionsschnittstelle wird der Polymorphismus häufig als TGFα/TaqI bezeichnet (Ardinger et al., 1989).

Im Gegensatz dazu liegt die Mikrosatellitenregion des Polymorphismus D2S443 (auch GGAA4D07) nicht innerhalb des TGFα-Gens, sondern in dessen unmittelbarer Nähe. Hierbei handelt es sich um eine kurze repetitive Sequenz eines AAGG-Motivs. Es können 12 Allele unterschieden werden, welche sich durch ihre Fragmentlänge bzw. die Wiederholungsanzahl der AAGG-Repeats unterscheiden.

Das TGFβ3-Gen liegt auf dem Chromosom 14q24 und die in dieser Studie untersuchte 6bp-Deletion in dessen 5' untranslatierten Bereich bzw. der Promotorregion. Innerhalb der amplifizierten Sequenz finden sich jeweils 6bp-

Repeats (Motiv „AGAGGG“), wobei eine dieser Wiederholungen deletiert sein kann. Das Wildtyp-Amplifikat zeigt eine Länge von 254 bp, wohingegen das deletierte Allel durch eine Länge von 248 bp gekennzeichnet ist.

Zur Untersuchung der drei Längenpolymorphismen der Gene TGF α und TGF β 3 wurde eine Multiplex-PCR entwickelt. Um die einzelnen PCR-Amplifikate in der Fragmentlängenanalyse sichtbar zu machen, wurden jeweils die Reversprimer am 5'-Ende fluoreszenzmarkiert. Für TGF α - Δ 4bp und TGF β 3- Δ 6bp wurde der Farbstoff HEX gewählt, der Primer für TGF α -D2S443 wurde mit FAM markiert. Die Primersequenzen sowie die Produktgrößen und die jeweilige Allelzahl sind der Tabelle 3.1 zu entnehmen.

Tab. 3.1 Multiplex-Primer

| Sequenzvariante | Primersequenz | Produktgröße | Allel- anzahl |
|-------------------------------|---|---------------------------------|------------------|
| TGF α Δ 4bp* | fwd 5'-GAA TTT GGC CTA TGA AAAGGTCT-3' rev 5'-ACA TCC TGA TGT CTT CAT GGA T-3' | 117bp bzw. 113/ Δ 4bp | 2 |
| TGF α D2S443** | fwd 5'-GAG AGG GCA AGA CTT GGA AG-3' rev 5'-ATG GAA GAG CGT TCT AAA ACA-3' | 212 - 252bp | 12 |
| TGF β 3 Δ 6bp*** | fwd 5'-GGC TTT TCC TGT GCC TGT TTA A-3' rev 5'-CGC TCA TTC CCT TGG ACT TGA-3' | 254bp bzw. 248/ Δ 6bp | 2 |

* nach Basart et al. (1994).

** mehrfach beschriebene Primer für den Polymorphismus GGAA4D07 (Mayall et al., 1999; Paulson et al., 1996).

*** nach Murray et al. (1994) - Cooperative Human Linkage Center Primer Server

Die Amplifikation erfolgte in einem 12 μ l-Ansatz in einem Biometra T3000 Thermocycler. Dabei wurde der Qiagen Multiplex PCR Master Mix (Fa. Qiagen) eingesetzt. Die genaue Zusammensetzung der Reaktion ist in Tabelle 3.2 dargestellt, das PCR-Programm des Thermocyclers in Tabelle 3.3.

Tab. 3.2 Multiplexreaktionsansatz

| | |
|---|---------------|
| Multiplex PCR Master Mix | 6,25 μ l |
| Primer TGF α - Δ 4bp fwd + rev (10pmol) | 0,125 μ l |
| Primer TGF β 3-6bp fwd + rev (10pmol) | 0,125 μ l |
| Primer TGF α -D2S443 fwd + rev (10pmol) | 0,063 μ l |
| DNA | 0,5 ng |
| Aqua bidest. | ad 12 μ l |

Tab. 3.3 Multiplex-PCR-Programm

| Temperatur | Dauer | |
|------------|--------|----------------|
| 95°C | 15 min | |
| 94°C | 30 sec | } 34 Zyklen |
| 50°C | 90 sec | |
| 72°C | 90 sec | |
| 72°C | 10 min | |

3.2.4.2 PCR zur Genotypisierung des Substitutionspolymorphismus T→C im Gen *TGFβ3* (rs3917200)

Diese Sequenzvariante (auch als X5.1 bezeichnet) ist im Intron 4 des *TGFβ3*-Gens lokalisiert. Bei diesem Polymorphismus (ref. single nucleotide polymorphism rs 3917200, NCBI) kommt es zu einem Einzelnukleotidaustausch T → C an der Position -38 relativ zur Intron 4-Exon 5 Grenze (gemessen an der Sequenz NG_011715.1 im NCBI). Mit Frequenzhäufigkeiten von 66 – 97% in den unterschiedlichen Populationen (Reference SNP Cluster Report, NCBI) stellt das T-Nukleotid das Wildtypallel dar. In anderen Untersuchungen wird der Polymorphismus mit der Lokalisation -24 angegeben (Lidral et al., 1998; Reutter et al., 2008).

Die zur Amplifikation verwendeten Primer wurden der Literatur entnommen (Pletsch, 2003), leicht modifiziert und sind in Tabelle 3.4 dargestellt.

Tab. 3.4 *TGFβ3*-Primer (rs3917200)

| Sequenzvariante | Primersequenz | Produktgröße | Allel-anzahl |
|---------------------------|---|--------------|--------------|
| <i>TGFβ3</i> rs3917200 | fwd 5'-TGA TGG GGC GTG TGG AG-3' rev 5'-GTC GAG CCG GTG TGG-3' | 195bp | 2 |

Die PCR erfolgte in einem 50µl-Ansatz mit einer GoldStar[®] DNA Polymerase (Fa. Eurogentec), die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes sowie das PCR-Programm sind in den Tabellen 3.5 und 3.6 zu ersehen.

Tab. 3.5 PCR-Reaktionsansatz TGF β 3 rs3917200

| | |
|---|---------------|
| 10 x PCR-Puffer | 5 μ l |
| MgCl ₂ | 8 μ l |
| dNTPs (10mM) | 1 μ l |
| BSA | 1 μ l |
| DMSO | 2,5 μ l |
| Primer TGF β 3 rs3917200 fwd (10pmol) | 2,5 μ l |
| Primer TGF β 3 rs3917200 rev (10pmol) | 2,5 μ l |
| GoldStar® DNA Polymerase | 0,2 μ l |
| DNA | 2 ng |
| Aqua bidest. | ad 50 μ l |

Tab. 3.6 PCR-Programm TGF β 3 rs3917200

| Temperatur | Dauer | |
|------------|--------|----------------|
| 94°C | 3 min | |
| 94°C | 1 min | } 34 Zyklen |
| 62°C | 1 min | |
| 72°C | 30 sec | |
| 72°C | 5 min | |

3.2.4.3 PCR zur Genotypisierung des Gens FOXF2

Das Forkhead-Box Gen FOXF2 liegt auf dem Chromosom 6p25.3. In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden Exons sowie die jeweiligen Übergänge zu den untranslatierten Regionen vollständig sequenziert und mit der bekannten DNA-Sequenz (NCBI Reference Sequence: NT_007592.15) als Referenz verglichen.

Exon 1 besitzt eine Länge von 1170bp und weist sehr GC-reiche Sequenzabschnitte auf, was die Amplifikation beträchtlich erschwert. Es wurden drei Primer-Paare für die schrittweise Amplifikation entwickelt. Da in einigen Fällen die Vervielfältigung des dritten Teilstückes nicht möglich war, wurde dies erneut in zwei Unterfragmente geteilt und mittels der Primer-Paare 1-3a und 1-3b amplifiziert. Exon 2, mit einer Länge von 164 bp, wurde in einem Stück amplifiziert. Bei beiden Exons wurde über die Intron/Exon-Grenzen hinweg vervielfältigt. Für jedes Fragment wurden individuelle PCR-Bedingungen optimiert.

Die Primer wurden mit der NCBI/Primer-BLAST Software erstellt. Deren Sequenzen sowie die Produktgrößen sind der Tabelle 3.7 zu entnehmen. Die Konzentration der Primerlösung wurde jeweils auf 10pmol eingestellt.

Tab. 3.7 Primer zur Amplifikation des FOXF2-Gens

| Sequenzvariante | Primersequenz | Produktgröße |
|-----------------|---|--------------|
| FOXF2 Ex 1-1 | fwd 5'-GGG CGC TCG CAG GGC TTC T-3' rev 5'-GGG GCG CTG GCC GAA TTG-3' | 302 bp |
| FOXF2 Ex 1-2 | fwd 5'-CGG AGA CCA CCT CCT CCT-3' rev 5'-GGT CCA GTA GTG GCC CTT G-3' | 401 bp |
| FOXF2 Ex 1-3 | fwd 5'-AGG GCT GGA AGA ACT CGG T-3' rev 5'-CAC CAC GCT CAC AGC AGC CA-3' | 993 bp |
| FOXF2 Ex 1-3a | fwd 5'-ACG CTC AGC GAG ATC TAC CAGTT-3' rev 5'- GGG TTG GGC GAC ATG TGC-3' | 476 bp |
| FOXF2 Ex 1-3b | fwd 5'-CAG CCA CGC GCA CCC TCA-3' rev 5'- CAC CAC GCT CAC AGC AGC CA-3' | 638 bp |
| FOXF2 Ex2 | fwd 5'-GCA CAG CAG CAC CTT TTG TA-3' rev 5'-GCC TGC ATG TGA CTT GAA TC-3' | 355 bp |

Die Amplifikation der einzelnen Exonabschnitte des Exon 1 gestaltete sich aufgrund des extrem hohen GC-Gehaltes als schwierig. Daher konnten nicht für alle Fragmente die gleichen PCR-Bedingungen angewendet werden. Nach umfangreichen Optimierungen erwiesen sich die in Tabelle 3.8 dargestellten Zusammensetzungen der Reaktionsansätze sowie die in Tabelle 3.9 aufgeführten PCR-Programme als am besten geeignet.

Tab. 3.8 PCR-Reaktionsansätze FOXF2 Exon 1

a) Reaktionsansatz für die PCR des Fragmentes Exon 1-1

| | |
|------------------------------|-----------|
| GC Reaction Buffer (NEB) | 5 µl |
| dNTP (10mM) | 0,5 µl |
| High GC-Enhancer (NEB) | 3 µl |
| Primer fwd + rev (10 pM) | je 0,5 µl |
| OneTaq® DNA Polymerase (NEB) | 0,125 µl |
| DNA | 2 ng |
| Aqua bidest | ad 25 µl |

b) Reaktionsansatz für die PCR der Fragmente Exon 1-2, 1-3 und 1-3b

| | |
|-----------------------------------|-----------|
| Multiplex PCR Master Mix (Qiagen) | 6,25 µl |
| DMSO | 1 µl |
| Primer fwd + rev (10 pM) | je 0,3 µl |
| DNA | 2 ng |
| Aqua bidest | ad 12 µl |

Fortsetzung Tab. 3.8 PCR-Reaktionsansätze FOXF2 Exon 1**c) Reaktionsansatz für die PCR des Fragmentes 1-3a**

| | |
|--------------------------|-----------|
| 10 x PCR Buffer | 5 µl |
| dNTP (10mM) | 1 µl |
| DMSO | 2,5 µl |
| BSA | 1 µl |
| MgCl ₂ | 8 µl |
| Primer fwd + rev (10 pM) | je 2,5 µl |
| GoldStar® DNA Polymerase | 0,2 µl |
| DNA | 2 ng |
| Aqua bidest | ad 50 µl |

Tab. 3.9 PCR-Programme FOXF2 Exon 1

| Temperatur | Dauer | | Temperatur | Dauer | | Temperatur | Dauer | |
|-------------|--------|----------------|------------------------|--------|----------------|--------------|-------|----------------|
| 94°C | 2 min | } 30 Zyklen | 95°C | 15 min | } 34 Zyklen | 94°C | 3 min | } 34 Zyklen |
| 94°C | 30 sec | | 94°C | 30 sec | | 94°C | 1 min | |
| 61°C | 45 sec | | X°C | 90 sec | | 58°C | 1 min | |
| 68°C | 60 sec | | 72°C | 90 sec | | 72°C | 2 min | |
| 68°C | 5 min | | 72°C | 15 min | | 72°C | 5 min | |
| a) Exon 1-1 | | | b) Exon 1-2, 1-3, 1-3b | | | c) Exon 1-3a | | |

(X entspricht den spezifischen Annealingtemperaturen der einzelnen Primer-Paare, Ex 1-2: 60°C, Ex 1-3: 56°C, Ex 1-3b: 63°C)

Die PCR für Exon 2 wurde in einem 50µl-Ansatz mit GoldStar® DNA Polymerase (Eurogentec) ohne DMSO durchgeführt; die genaue Zusammensetzung des Ansatzes und das PCR-Programms sind in den Tabellen 3.10 und 3.11 zu finden.

Tab. 3.10 PCR-Reaktionsansatz FOXF2 Exon 2

| | |
|-----------------------------|----------|
| 10 x PCR-Puffer | 5 µl |
| MgCl | 3 µl |
| dNTPs (10mM) | 1 µl |
| BSA | 1 µl |
| Primer FOXF2 Ex2 fwd (10pM) | 2,5 µl |
| Primer FOXF2 Ex2 rev (10pM) | 2,5 µl |
| GoldStar® DNA Polymerase | 0,2 µl |
| DNA | 1 ng |
| Aqua bidest. | ad 50 µl |

Tab. 3.11 PCR-Programm FOXF2 Exon 2

| Temperatur | Dauer | |
|------------|-------|----------------|
| 94°C | 3 min | |
| 94°C | 1 min | } 34 Zyklen |
| 52°C | 1 min | |
| 72°C | 2 min | |
| 72°C | 5 min | |

3.2.5 Fragmentlängenanalyse

Die Auftrennung der PCR-Fragmente zur Fragmentlängenanalyse erfolgte über eine Kapillarelektrophorese mittels ABI 3130 Genetic Analyzer. Dazu wurden je 0,5 µl des Multiplex-PCR-Produktes in einer Mikrotiterplatte mit jeweils 12 µl Formamid und 0,25 µl eines MPX-2 Längenstandards (SERAC) versetzt. Es folgte eine Denaturierung für 3 min bei 95°C und eine weitere 3-minütige Inkubation auf Eis, bevor die Fragmente im ABI 3130 Genetic Analyzer separiert wurden. Die Injektionszeit für die Proben betrug 5 Sekunden.

Um eventuelle Laufunterschiede zwischen den einzelnen Analysetagen zu erkennen, wurde eine Allel-Leiter für alle drei Gene hergestellt (s. Abb. 8), welche bei jeder Fragmentlängenbestimmung mit analysiert wurde. Dazu wurde je eine homozygote Wildtyp-Probe für die Polymorphismen TGF α - Δ 4bp und TGF β 3- Δ 6bp ausgewählt und sequenziert um das Vorhandensein der Deletion auszuschließen und die Fragmentgröße zu bestimmen. Für TGF α -D2S443 wurden drei homozygote Proben unterschiedlicher Länge sequenziert. Die PCR-Produkte wurden in unterschiedlichen Mengenverhältnissen eingesetzt um ausgewogene Peakhöhen der Leiter zu erreichen. Die Auswertung der Elektropherogramme und die Berechnung der Fragmentlängen erfolgte mit der GeneMapperID™ Analysis Software der Firma ABI.

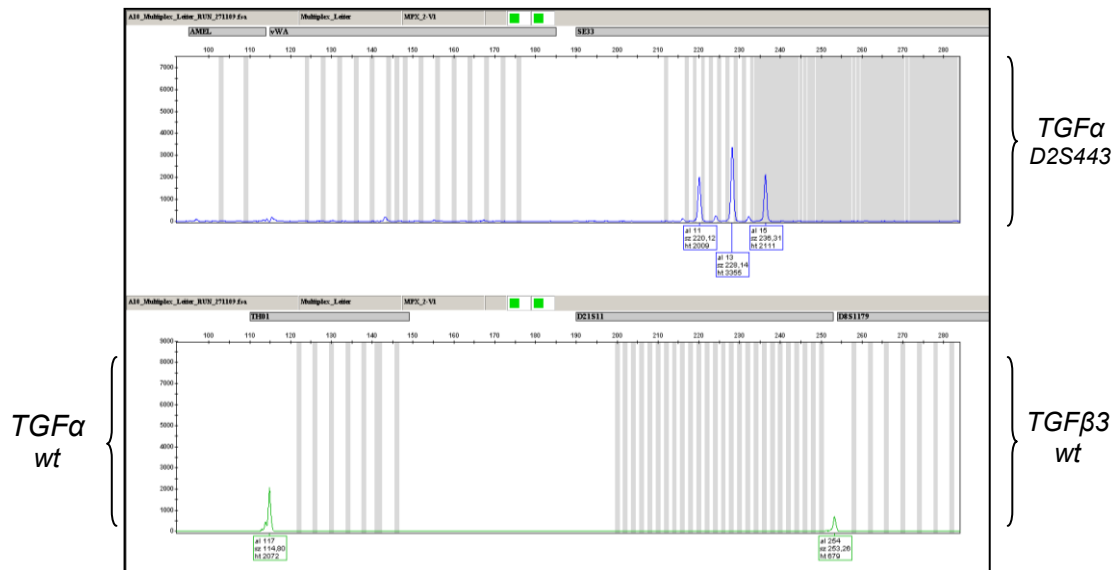


Abb. 8 Zusammensetzung der verwendeten Allelleiter. In blau dargestellt drei Allele des D2S443-Polymorphismus mit zugeordneter Repeat-Anzahl. In grün die Wildtypallele der Polymorphismen TGF α - Δ 4bp und TGF β 3- Δ 6bp.

Alle im TGF α -D2S443 als homozygot typisierten Proben wurden ein weiteres Mal in einer Singleplex-PCR getestet um ein allelic-drop out auszuschließen.

In einem Fall wurden zusätzlich die Polymorphismen D2S441 und D2S1338 untersucht um eine mögliche Verdreifachung des analysierten Bereiches zu erkennen. Weiterhin wurde an einem Familien-Trio eine Multiplex-Analyse mittels PowerPlex[®] 16 System (Fa. Promega) nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.2.6 Gelelektrophorese

Alle zu sequenzierenden Proben wurden nach der Amplifikation auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen, um den Erfolg der PCR zu überprüfen. Anhand dessen wurde die einzusetzende Amplifikatmenge für die Sequenzreaktion abgeschätzt.

Zur Herstellung eines 8,9%igen Polyacrylamidgels wurden 4,95 ml 30%-iges Acryl PDA, 8,25 ml Aqua bidest., 3,3 ml Tris-Sulfat Puffer (35mM), 115,5 μ l 10%-iges APS und 5,85 μ l TEMED gemischt und auf eine mit Adhesive Tape präparierte Glasplatte gegossen. Nach der Polymerisierung des Gels wurden im Abstand von ca. 2 mm Sample Application Pieces aufgebracht, auf welche je 5 μ l (für TGF β 3 rs3917200) bzw. 3 μ l (für FOXF2) des PCR-Amplifikats pipettiert wurden. Zusätzlich wurde ein 100bp-Längenstandard aufgetragen.

Daraufhin erfolgte die Gelelektrophorese in einem Multiphor II Gerät unter folgenden Laufbedingungen: 1000V, 40 mA, 20 W, bei 12°C.

Auf die Elektrophorese folgte eine Silberfärbung des Gels. Dabei wurde das Gel für 5 Minuten in 2,5%-iger HNO₃ geschüttelt und daraufhin drei Mal in Aqua bidest. gespült. Nach einer 20-minütigen Inkubation in einem AgNO₃/Formaldehyd-Gemisch wurde erneut mit Aqua bidest. gespült. Mit einer 2%-igen Na₂CO₃-Lösung, welche 500 µl Formaldehyd enthält, wurde das Gel entwickelt bis eine Bandenausbildung zu sehen war. Danach wurde das Gel für 3 Minuten in 4,5%-iger Essigsäure inkubiert um die Reaktion zu stoppen und wiederum mit Aqua bidest. gespült.

3.2.7 Aufreinigung der PCR-Produkte

Um nicht gebundene Primer und Nukleotide sowie andere mögliche Inhibitoren zu entfernen, wurden die PCR-Produkte mit dem QIAquick® PCR Purification Kit (Fa. Qiagen) bzw. dem MinElute PCR Purification Kit (Fa. Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Bei besonders schwachen Gelbanden, das heißt sehr geringen PCR-Produktmengen, wurde ExoSAP-IT® (Fa. Affymetrix) eingesetzt.

3.2.8 DNA-Sequenzierung

Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden in eine erneute Amplifikation eingesetzt. Die zu untersuchenden Proben wurden jeweils als Doppelbestimmung in beide Richtungen analysiert. Für die Durchführung der Sequenzierung wurde der BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Fa. Applied Biosystems) genutzt. Die Zusammensetzung der Sequenzreaktion und das PCR-Programm sind in den Tabellen 3.12 und 3.13 dargestellt.

Tab. 3.12 Sequenzier-Reaktionsansatz

| | |
|-----------------------------|----------------|
| Big Dye-Sequenziermix | 2 µl |
| Primer fwd oder rev (5pmol) | 1,25 µl |
| PCR-Produkt | bis zu 6,75 µl |
| Aqua bidest. | ad 10 µl |

Um Probenmaterial zu sparen wurde im Verlauf der Versuche ein Assay mit halbiertem Ansatz entwickelt, bei welchem 2,5 µl PCR-Produkt ausreichen.

Tab. 3.13 PCR-Programm für die Sequenzierung

| Temperatur | Dauer | } 25 Zyklen |
|------------|--------|----------------|
| 96°C | 10 min | |
| 96°C | 15 sec | |
| 50°C | 15 sec | |
| 60°C | 4 min | |

An die Sequenzierreaktion schloss sich eine erneute Aufreinigung an. Dazu wurde das DyeEx 2.0 Spin Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben verwendet. Die gereinigten Amplifikate wurden in 12 µl Formamid gelöst und auf eine 96-well Platte aufgetragen, um sie mittels ABI 3130 Genetic Analyzer zu sequenzieren. Die Auswertung erfolgte über die ApE- A Plasmid Editor Software (M. Wayne Davis).

3.3 Statistische Auswertung der Assoziationsstudie

Die statistische Analyse der Ergebnisse der genetischen Untersuchungen soll klären, ob Unterschiede zwischen den Patienten und Kontrollen aus zufallsbedingter Streuung oder aus tatsächlichen Effekten resultieren. Als Assoziation bezeichnet man dabei die Tendenz zweier Merkmale (hier genetischer Polymorphismus und Ausbildung einer Spalte) überzufällig häufig gemeinsam aufzutreten. Dazu wird eine Nullhypothese H_0 aufgestellt, die besagt, dass zwischen den untersuchten Kollektiven keine Differenz hinsichtlich des analysierten Parameters auftritt bzw. sich Unterschiede zufällig eingestellt haben - also im hiesigen Fall kein Zusammenhang zur LKGS besteht (H_0 : Die Variablen ‚Merkmal M‘ und ‚Erkrankung‘ sind stochastisch unabhängig). Dem entgegen wird eine Alternativhypothese H_1 aufgestellt, welche einen Zusammenhang zwischen den Ergebnissen und der Krankheit postuliert. Der Signifikanztest soll die Nullhypothese wider- und die Alternativhypothese belegen. Es wird die Wahrscheinlichkeit (p-Wert des χ^2 -Tests) berechnet, mit welcher die erhaltenen Ergebnisse durch Zufall entstanden sind (wenn H_0 zuträfe). Liegt diese Wahrscheinlichkeit unter dem Signifikanzniveau $\alpha=0,05$ wird die Nullhypothese verworfen und das Ergebnis als signifikant eingeordnet. Dabei bleibt eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% bestehen, das heißt in 5% der als signifikant eingestuften Ergebnisse trifft in Wahrheit die Nullhypothese zu. Je kleiner der p-Wert desto weniger spricht für ein tatsächlich zufälliges Geschehen.

In der vorliegenden Arbeit wird der Chi-Quadrat-Test (mit Konfidenzintervall 95%) durchgeführt und neben dem χ^2 der zugehörige p-Wert ermittelt. Dieser Test dient der Prüfung der Verteilungsmuster der erhaltenen Ergebnisse (Allele) anhand ihrer Häufigkeiten. Es wird jeweils die Abweichung zwischen erhaltenen und erwarteten Werten berechnet; je größer die Differenz, desto mehr spricht für einen Zusammenhang zwischen den untersuchten Parametern.

3.3.1 Fall-Kontroll-Studie

Fall-Kontroll-Studien werden zur quantitativen Erforschung von Ursache-Wirkung-Zusammenhängen nominaler Zufallsvariablen (beispielsweise mit den Werten: „erkrankt“, „nicht erkrankt“ oder den möglichen Ausprägungen eines Genotyps an einem Locus) genutzt. Dabei werden retrospektiv Eigenschaften zweier Gruppen miteinander verglichen, um eine mögliche Assoziation zwischen einem Phänotyp und einem oder mehreren Kandidatengen-Loci nachzuweisen. In der vorliegenden Untersuchung sind dies die genetischen Variationen in den Genen TGF α , TGF β und FOXF2 in einem Patientenkollektiv spaltentragender Personen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe nicht betroffener Probanden der gleichen Population. Es wird untersucht, ob die genetischen Veränderungen mit nicht zufälliger Häufigkeit innerhalb der Patientengruppe vorkommen. Ist die Frequenz bestimmter Polymorphismen/Mutationen (bzw. der verschiedenen Genotypen) signifikant höher, liegt eine Assoziation zwischen Merkmal und Ausprägung nahe. Dies bedeutet jedoch nicht, dass zwingend ein ätiologischer Zusammenhang zwischen diesem Genotyp und der Krankheit vorliegen muss. Der untersuchte Polymorphismus kann durch das Linkage Disequilibrium (LD) mit dem eigentlich kausalen Polymorphismus gekoppelt sein, und so eine Assoziation erzeugen. Die Fall-Kontroll-Studie ist statistisch gesehen ein Spezialfall der $m \times n$ – Felder – Kontingenztafel mit $m = 2$ Spalten und n Zeilen. Das hier verwendete Schema einer $2 \times n$ – Felder Kontingenztafel T zeigt Tabelle 3.14. Diese Tabelle T dient als Grundlage eines statistischen Tests zur Prüfung der stochastischen Unabhängigkeit der Zufallsvariablen ‚Merkmal M‘ und ‚Erkrankung‘.

Tab. 3.14 Design-Schema (Kontingenztafel) einer Fall-Kontroll-Studie (Tabelle T)

| | Kontrollen | Fälle | Summe |
|-------|----------------------|----------------------|--------------|
| M_1 | $A(0,1)$ $E(0,1)$ | $A(1,1)$ $E(1,1)$ | N_{M1} |
| M_2 | $A(0,2)$ $E(0,2)$ | $A(1,2)$ $E(1,2)$ | N_{M2} |
| | * | * | * |
| | * | * | * |
| | * | * | * |
| M_n | $A(0,n)$ $E(0,n)$ | $A(1,n)$ $E(1,n)$ | N_{Mn} |
| | N_K | N_F | N |

Bei einer Fall-Kontroll-Studie werden N_K Kontrollen (Nicht-Erkrankte) und N_F Fälle (Erkrankte) zu einer Stichprobe der Größe N zusammengefasst. Jedes Stichprobenelement wird auf das Vorliegen der einander ausschließenden Merkmalsausprägungen M_1, \dots, M_n des Merkmals M untersucht. Die Ergebnisse der Untersuchung werden summarisch in die Tabelle eingetragen. So ist die Gesamtzahl der nicht erkrankten Elemente der Stichprobe, welche außerdem das Merkmal M in der Ausprägung M_j besitzen, gleich $A(0,j)$, während die Anzahl der Erkrankten mit der Merkmalsausprägung M_j in der Stichprobe den Wert $A(1,j)$ hat. Aufgrund der Stichproben unter der Nullhypothese H_0 ergeben sich erwartete Häufigkeiten $E(i,j)$. Die Teststatistik χ^2 (Chi-Quadrat) des Unabhängigkeitstests misst die Abweichung der Zelleneinträge $A(i,j)$ von den erwarteten Häufigkeiten $E(i,j)$. Die ganzzahligen positiven Einträge $A(i,j)$ in der Tabelle T werden die *Zellenbesetzungen* genannt. Wenn alle Einträge $A(i,j)$ die heuristische Minimalbedingung $A(i,j) \geq 5$ erfüllen, so kann für die Berechnung des p-Wertes aufgrund des Satzes von de Moivre – Laplace in guter Näherung die klassische Chi-Quadrat-Verteilung verwendet werden.

In vielen praktischen Anwendungen kann diese Minimalbedingung nicht erfüllt werden. In der Folge sind bei der Verwendung der klassischen Chi-Quadrat-Näherung Fehler des p-Wertes zu erwarten. Diese können durch Einsatz einer quasi-exakten Berechnungsmethode des p-Wertes vermieden werden. Der Grundgedanke der quasi-exakten Berechnungsmethode ist es, den p-Wert mittels einer direkten Berechnung oder einer Monte-Carlo-Simulation der Wahrscheinlichkeitsverteilungen der Zelleneinträge $A(i,j)$ zu schätzen. Der klassische Fall einer quasi-exakten p-Wert-Schätzung ist FISHERs exakter Test (Fisher, 1922). Dieser (2-seitige Exakte Signifikanztest) findet aber nur bei einer besonders einfachen Fallkonstellation mit 2x2-Kontingenztafel Anwendung. In der vorliegenden Arbeit also immer dann, wenn

nur zwei beobachtete Genotypen vorliegen und mindestens einer der vier Werte kleiner als 5 ist. Die statistischen Berechnungen des klassischen Chi-Quadrat- und Fisher-Tests wurden mit der SPSS Statistics Software durchgeführt.

In Fällen von schwach besetzten Kontingenztafeln, abweichend der 2x2-Form, wurde ein von Dr. rer. nat. Dipl.-Math. Michael Hubig erstellter, quasi-exakter Test verwendet. Dieser ersetzt die Berechnung der exakten Wahrscheinlichkeitsverteilungen vollständig durch Monte-Carlo-Simulationen. Es wurden $K = 10^5$ Tabellen mit den fixierten Randsummen N_K und N_F simuliert, wobei zur Monte-Carlo-Berechnung der nicht fixierten Randsummen N_{M1}, \dots, N_{Mn} die Schätzer $p_{Mj}^{\wedge} := N_{Mj} / N$ der Merkmalswahrscheinlichkeiten $p_{Mj} = P(M_j | H_0)$ verwendet wurden. Danach erfolgte die Monte-Carlo-Berechnung der N_K Kontrollen in der zu simulierenden Tabelle. Für jede simulierte Tabelle wurde schließlich ein χ^2 -Wert errechnet und ermittelt, ob dieser oberhalb oder unterhalb des χ^2 -Wertes χ^2_T für die aus den echten Daten gewonnene Tabelle T lag. Die Anzahl K_T der oberhalb von χ^2_T liegenden χ^2 -Werte erlaubte dann die Schätzung p^{\wedge} des p-Wertes zur Tabelle T durch: $p^{\wedge} := K_T / K$.

3.3.2 familienbasierte Assoziationsstudie

In Fällen in denen neben dem betroffenen Kind auch genetisches Material der Eltern zur Verfügung steht, kann ein so genannter Transmission-Disequilibrium-Test (TDT) durchgeführt werden (Spielman et al., 1993; Victor, 2007). Dieser hat zum Ziel die Häufigkeit der an das erkrankte Kind vererbten Allele zu untersuchen, wobei die nicht vererbten Allele als interne Kontrollen dienen. Somit kann ein falsch-positiver Assoziationseffekt durch ein ungeeignetes Kontrollkollektiv, zum Beispiel aufgrund von Populationsvermischungen innerhalb der Gruppe, vermieden werden. Um die Vererbung des Allels durch den jeweiligen Elternteil eindeutig nachweisen zu können, müssen die Eltern an den betreffenden Stellen heterozygot sein. Es wird berechnet, inwieweit die Vererbungshäufigkeit von 0,5 abweicht, da im Idealfall die Wahrscheinlichkeit der Vererbung jedes der beiden Allele bei 50% liegt. Der p-Wert wird nach dem McNemar Test berechnet. Aufgrund der geringen Anzahl untersuchter Eltern und der vermehrten Homozygotie an den betreffenden Loci, wird in der vorliegenden Arbeit eine erweiterte Variante des zuvor beschriebenen TDT nach Bickeböller und Clerget-Darpoux (1995) angewandt (Teststatistik T_m nach Formel (5) auf Seite 868). Hierbei können auch homozygote Elternteile in die Berechnung einbezogen werden.

4 Ergebnisse

In der vorliegenden Studie wurde genetisches Material von 75 Patienten mit nicht-syndromassoziierter LK±GS bzw. isolierter GS sowie von 105 gesunden Kontrollen der gleichen mitteldeutschen Population untersucht. Zusätzlich stand für 10 Patienten Untersuchungsmaterial der Eltern zur Verfügung. Ziel der Studie war es, Polymorphismen/Mutationen in den Genen TGF α , TGF β 3 und FOXF2 auf eine mögliche Assoziation zur Ausbildung von LKGS zu untersuchen. Aufgrund der zeitlich getrennten embryologischen Entwicklung von Lippen-Kiefer-Spalten und isolierten GS wird im Folgenden jeweils zwischen zwei Patientengruppen differenziert. Das Kollektiv „LK±GS“ umfasst sowohl ein- und beidseitige isolierte Lippenspalten, Lippenkieferspalten als auch Lippen-Kiefer-Gaumenspalten. Für die zweite Gruppe „isolierte GS“ lag keine Information vor, ob diese ein- oder beidseitig auftrat. Angesichts der zum Teil sehr geringen Menge an extrahierbarer DNA und keiner Möglichkeit einer erneuten Probenentnahme konnten bei einigen Probanden für einzelne Loci keine gesicherten Ergebnisse erlangt werden.

4.1 Transforming Growth Factor alpha (TGF α)

4.1.1 Analyse des Polymorphismus TGF α - Δ 4bp

Der Längenpolymorphismus TGF α - Δ 4bp ist innerhalb des Intron 5 des TGF α -Gens lokalisiert. Er wurde in dieser Studie bei 75 Patienten, davon 58 Träger einer LK±GS und 17 Träger einer isolierten GS, sowie 105 Kontrollen untersucht. Das Wildtyp-Allel stellt sich durch ein 117 bp langes PCR-Fragment dar, während der Polymorphismus durch eine 4 bp große Deletion der Nukleotide „TAAT“ charakterisiert ist. Unabhängig von Spaltart und Geschlecht zeigt sich die in Abb. 9 veranschaulichte Verteilung der Genotypen. Der homozygote Wildtyp, das heißt beide Allele besitzen reinerbig das gleiche Wildtypmerkmal, stellt in beiden Gruppen den häufigsten Genotyp dar. Auch der heterozygote Genotyp, bestehend aus einem Wildtypallel und einem deletierten Δ 4bp-Allel trat vergleichbar häufig auf. Es war kein statistisch signifikanter Unterschied der Allelverteilung zwischen Patienten- und Kontrollgruppe zu beobachten ($p = 0,43$).

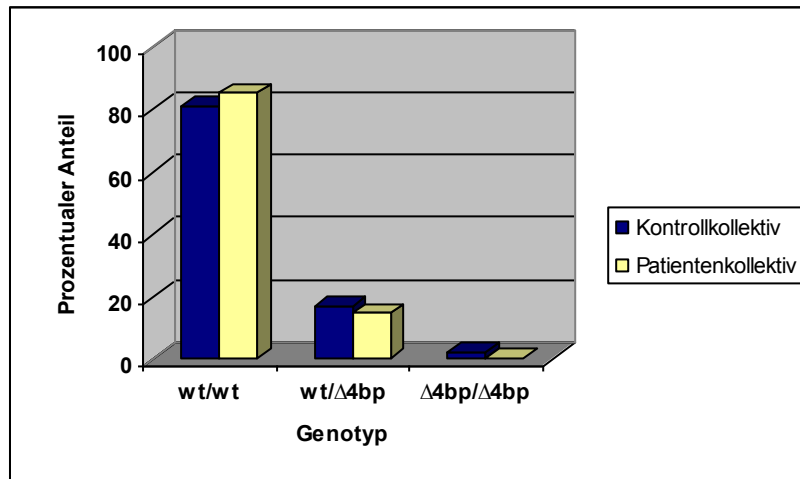


Abb.9 Verteilung der Genotypen des Polymorphismus TGF α - Δ 4bp (unabhängig von Spaltart und Geschlecht)

4.1.1.1 Fall-Kontroll-Analyse zum Polymorphismus TGF α - Δ 4bp bei LK \pm GS-Patienten

Untersucht wurden 58 Patienten mit LK \pm GS und 105 gesunde Kontrollen. Es ist festzustellen, dass mit 50 von 58 Patienten und 85 von 105 Kontrollen der homozygote Wildtyp den weitaus häufigsten Genotyp darstellt (Tab. 4.1). Die heterozygote Konstellation mit einem deletierten Allel trat mit 13,8% in der Patientengruppe und 17,1% in der Kontrollgruppe auf. Bei zwei Kontrollpersonen konnten zwei deletierte Allele nachgewiesen werden. Diese Deletion wurde zusätzlich durch eine Sequenzanalyse bestätigt. Unter den Patienten war keiner homozygot für das Allel Δ 4bp. Somit liegt die Allelfrequenz des seltenen Allels mit 0,1 im Kontrollkollektiv leicht über der in den Patientenfällen (0,07). Bezüglich der Allelverteilung konnte mit einem p-Wert von 0,47 keine statistisch messbare Differenz zwischen gesamter Patienten- und gesamter Kontrollgruppe ermittelt werden. Auch hinsichtlich der Unterscheidung nach Geschlecht trat das deletierte Allel etwa gleichhäufig auf und es lag keine Signifikanz vor (♂ p = 0,52 bzw. ♀ p = 0,53).

Tab. 4.1 Genotypenverteilung, Allelfrequenz des seltenen Allels innerhalb der untersuchten Gruppe sowie p-Werte für den Polymorphismus TGF α - Δ 4bp bei LK \pm GS-Patienten und Kontrollen

| Untersuchungskollektiv | | Genotyp | | | Allelfrequenz des Δ 4bp-Allels | p-Wert |
|------------------------|-----------|---------|------------------|----------------------------|---------------------------------------|--------|
| | | wt/wt | wt/ Δ 4bp | Δ 4bp/ Δ 4bp | | |
| Patienten | (N= 58) | 50 | 8 | 0 | 0,07 | 0,47 |
| | ♂ (N= 34) | 29 | 5 | 0 | 0,07 | 0,52 |
| | ♀ (N= 24) | 21 | 3 | 0 | 0,06 | 0,53 |
| Kontrollen | (N= 105) | 85 | 18 | 2 | 0,1 | |
| | ♂ (N= 54) | 44 | 8 | 2 | 0,11 | |
| | ♀ (N= 51) | 41 | 10 | 0 | 0,1 | |

N = Probandenanzahl; wt \triangleq 117 bp; Δ 4bp \triangleq 113bp

4.1.1.2 Fall-Kontroll-Analyse zum Polymorphismus TGF α - Δ 4bp bei Patienten mit isolierter GS

Betrachtet man die Gruppe der GS-Träger lässt sich wiederum der homozygote Wildtyp als häufigster Genotyp erkennen (14/17). Die Allelfrequenz des seltenen Δ 4bp-Allels in der Patientengruppe ist mit 0,09 nahezu mit der des Kontrollkollektivs (0,1) vergleichbar (Tab. 4.2). Es konnte keine signifikante Abweichung der Allelverteilung zwischen den zwei Gruppen festgestellt werden ($p = 0,85$). Auch männliche und weibliche Patienten getrennt analysiert, lassen keine Signifikanz des seltenen Allels erkennen ($p = 0,88$ bzw. 1).

Tab. 4.2 Genotypenverteilung, Allelfrequenz des seltenen Allels innerhalb der untersuchten Gruppe sowie p-Werte für den Polymorphismus TGF α - Δ 4bp bei GS-Patienten und Kontrollen

| Untersuchungskollektiv | | Genotyp | | | Allelfrequenz des Δ 4bp-Allels | p-Wert |
|------------------------|-----------|---------|------------------|----------------------------|---------------------------------------|--------|
| | | wt/wt | wt/ Δ 4bp | Δ 4bp/ Δ 4bp | | |
| Patienten | (N= 17) | 14 | 3 | 0 | 0,09 | 0,85 |
| | ♂ (N= 5) | 4 | 1 | 0 | 0,1 | 0,88 |
| | ♀ (N= 12) | 10 | 2 | 0 | 0,08 | 1 |
| Kontrollen | (N= 105) | 85 | 18 | 2 | 0,1 | |
| | ♂ (N= 54) | 44 | 8 | 2 | 0,11 | |
| | ♀ (N= 51) | 41 | 10 | 0 | 0,1 | |

N = Probandenanzahl; wt \triangleq 117 bp; Δ 4bp \triangleq 113bp

4.1.2 Analyse des Polymorphismus D2S443

Der Längenpolymorphismus D2S443 befindet sich nicht innerhalb des TGF α -Gens, sondern im nicht-codierenden Bereich hinter diesem (in Richtung Centromer). Er wurde in der vorliegenden Studie an allen 75 LKGS-Patienten (davon 58 Träger einer LK \pm GS und 17 einer isolierten GS) und an 103 Kontrollen untersucht. Für diesen Mikrosatelliten sind 12 Allele bekannt. Sie werden in der vorliegenden Arbeit nach der Wiederholungsanzahl des „AAGG“-Repeats an diesem Locus benannt, wobei sich die möglichen Varianten zwischen 9 und 20 Repeats bewegen. Bei einem direkten Vergleich der kompletten Patientengruppe mit der Kontrollgruppe, lässt sich eine ähnliche Verteilung der Allele erkennen (Abb.10).

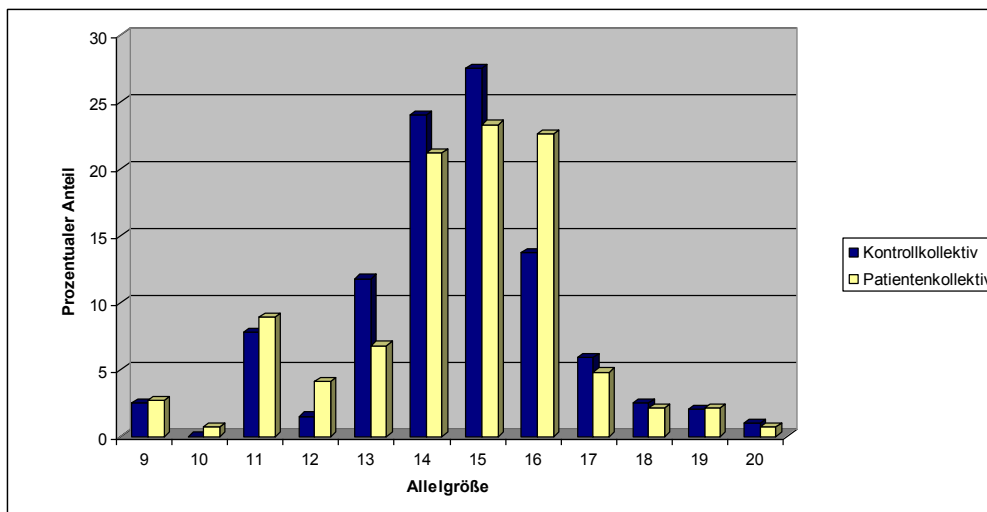


Abb.10 Verteilung der Einzelallele des Polymorphismus D2S443 (unabhängig von Spaltart und Geschlecht). Die Allelgröße bezieht sich auf die Anzahl der „AAGG“-Repeats an diesem Locus.

Bei zwei Patienten (P25, P68) konnte eine Mutation beobachtet werden. Anstatt einer Repeatanzahl von 18 wiesen diese eine Insertion eines Basenpaares auf, was in einem 18.1 Allel resultierte. Im Kontrollkollektiv konnte die Punktvariante 18.1 nicht nachgewiesen werden. Eine der männlichen Kontrollen (K59) zeigte eine weitere Mutation. Diese äußerte sich in der Darstellung von drei Allelen in der Fragmentlängenanalyse (Abb. 11). Um eine partielle Trisomie 2 auszuschließen, wurden zwei benachbarte Short Tandem Repeats untersucht (D2S441 und D2S1338), welche das Gen TGF α flankieren. Beide Polymorphismen wiesen nur zwei Allele auf, was gegen eine partielle Trisomie spricht. Da es sich bei diesem Probanden um eine gesunde Kontrollperson handelt und bei einer partiellen Trisomie

2p (kurzer Arm des Chromosoms) mit erheblichen Auswirkungen zu rechnen wäre, ist in diesem Fall von einem somatischen Mosaizismus auszugehen. Aufgrund der neuen Punktvariante sowie des Mosaizismus' wurden diese drei Fälle nicht in die statistische Berechnung aufgenommen.

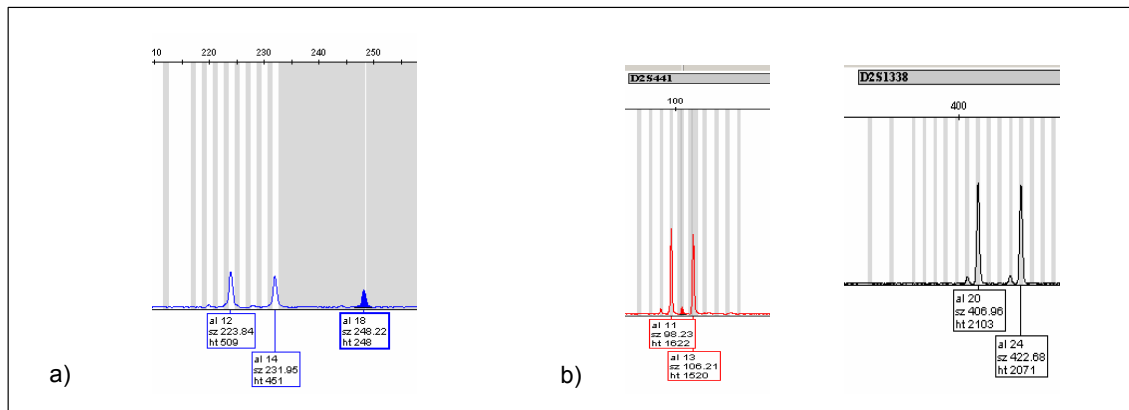


Abb.11 Kontrolle 59: Elektropherogramm der Fragmentlängenanalyse zum Polymorphismus D2S443 (a) bzw. den Polymorphismen D2S441 und D2S1338 (b).

Es wurde sowohl die Verteilung der Genotypen (Kombination aus beiden Allelen) als auch die Verteilung der Einzelallele statistisch analysiert. Dabei ergab sich in beiden Fällen kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen ($p = 0,3$ bzw. $p = 0,44$). Die Auswertung beider Varianten nach Unterscheidung bezüglich des Geschlechts ergab ebenfalls keine Signifikanz ($\text{♂ } p = 0,1$; $\text{♀ } p = 0,8$). Es lässt sich erkennen, dass keine signifikanten Auswirkungen auf die Ergebnisse der statistischen Analyse resultieren, wenn der Genotyp aus beiden Allelen oder die Einzelallele untersucht werden. Daher wird im Folgenden auf die Darstellung der Genotypen verzichtet und nur die Häufigkeit der Einzelallele betrachtet.

4.1.2.1 Fall-Kontroll-Analyse zum Polymorphismus D2S443 bei LK±GS-Patienten

In diese Analyse wurden 57 Patienten und 102 Kontrollen eingebracht. Aufgrund der 18.1 Mutation an diesem Locus bei einem männlichen LK±GS-Patienten wurde dieser nicht einbezogen. Um die Verteilung der Einzelallele zu untersuchen, ist die Anzahl der Allele innerhalb eines Kollektivs die Bezugsgröße, nicht etwa die Anzahl der untersuchten Probanden. Die häufigsten Allele waren in beiden Kollektiven die Allele 14 und 15. Die Allelfrequenzen bei den Patienten lagen für Allel 14 bei 0,21 und für Allel 15 bei 0,24; bei den Kontrollen für Allel 14 bei 0,24 und für Allel 15 bei

0,27. Die verbleibenden Frequenzen können der Tabelle 4.3 entnommen werden. Das Allel 13 tritt etwa doppelt so häufig im Kontrollkollektiv auf wie im Patientenkollektiv, während das Allel 16 mit einer Frequenz von 0,24 häufiger unter den Patienten zu finden ist (Frequenz bei Kontrollen 0,14). Trotz dieser Schwankungen ergibt sich bei der statistischen Analyse ein p-Wert von 0,26 und somit kein signifikanter Unterschied in der Allelverteilung zwischen den Kollektiven. Auch bei einer getrennten Betrachtung der Geschlechter lässt sich keine signifikante Differenz zwischen Patienten und Kontrollen ermitteln.

Tab. 4.3 Verteilung der Einzelallele des Polymorphismus D2S443 im LK±GS-Patienten- und Kontrollkollektiv sowie die zugehörigen Allelfrequenzen und p-Werte

| Untersuchungs- kollektiv | Allel | | | | | | | | | | | | p-Wert |
|-----------------------------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|--------|
| | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | |
| Patienten (n=114) | 2 | 1 | 12 | 4 | 6 | 24 | 27 | 27 | 6 | 2 | 3 | 0 | 0,26 |
| Allelfrequenz | 0,02 | 0,01 | 0,09 | 0,04 | 0,05 | 0,21 | 0,24 | 0,24 | 0,05 | 0,02 | 0,03 | 0 | |
| ♂ (n=66) | 1 | 0 | 4 | 3 | 5 | 14 | 18 | 15 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0,2 |
| Allelfrequenz | 0,02 | 0 | 0,06 | 0,05 | 0,08 | 0,21 | 0,27 | 0,23 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0 | |
| ♀ (n=48) | 1 | 1 | 8 | 1 | 1 | 10 | 9 | 12 | 4 | 0 | 1 | 0 | 0,45 |
| Allelfrequenz | 0,02 | 0,02 | 0,17 | 0,02 | 0,02 | 0,21 | 0,19 | 0,25 | 0,08 | 0 | 0,02 | 0 | |
| Kontrollen (n= 204) | 5 | 0 | 16 | 3 | 24 | 49 | 56 | 28 | 12 | 5 | 4 | 2 | |
| Allelfrequenz | 0,02 | 0 | 0,08 | 0,01 | 0,12 | 0,24 | 0,27 | 0,14 | 0,06 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | |
| ♂ (n=104) | 2 | 0 | 6 | 2 | 10 | 30 | 33 | 7 | 8 | 4 | 1 | 1 | |
| Allelfrequenz | 0,02 | 0 | 0,06 | 0,02 | 0,10 | 0,29 | 0,32 | 0,07 | 0,08 | 0,04 | 0,01 | 0,01 | |
| ♀ (n=100) | 3 | 0 | 10 | 1 | 14 | 19 | 23 | 21 | 4 | 1 | 3 | 1 | |
| Allelfrequenz | 0,03 | 0 | 0,10 | 0,01 | 0,14 | 0,19 | 0,23 | 0,21 | 0,04 | 0,01 | 0,03 | 0,01 | |

n= Anzahl der Allele

4.1.2.2 Fall-Kontroll-Analyse zum Polymorphismus D2S443 bei Patienten mit isolierter GS

Einer der männlichen Patienten mit isolierter Gaumenspalte wies die 18.1 Mutation an diesem Locus auf, weshalb nur 16 der insgesamt 17 GS-Patienten in die Untersuchung einbezogen wurden. Die Verteilung der einzelnen Allele innerhalb der Kollektive ist in Tabelle 4.4 dargestellt. Mit einer Frequenz von 0,22 traten auch im Gaumenspaltenkollektiv die Allele 14 und 15 am häufigsten auf. Es zeigt sich eine ähnliche Verteilung wie im Kontrollkollektiv. Die geringe Probenanzahl lässt jedoch

keine belastbare Beurteilung zu. Die statistische Berechnung der Häufigkeitsverteilung erbrachte keine Differenz zwischen den Kollektiven ($p = 0,62$). Genauso fanden sich bei der getrennten Betrachtung männlicher und weiblicher Probanden keine signifikanten Unterschiede ($\text{♂ } p = 0,3$; $\text{♀ } p = 0,84$).

Tab. 4.4 Verteilung der Einzelallele des Polymorphismus D2S443 im GS-Patienten- und Kontrollkollektiv sowie die zugehörigen Allelfrequenzen und p-Werte

| Untersuchungs- kollektiv | Allel | | | | | | | | | | | | p-Wert |
|-----------------------------|-------|----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|--------|
| | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | |
| Patienten (n=32) | 2 | 0 | 1 | 2 | 4 | 7 | 7 | 6 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0,62 |
| Allelfrequenz | 0,06 | 0 | 0,03 | 0,06 | 0,13 | 0,22 | 0,22 | 0,19 | 0,03 | 0,03 | 0 | 0,03 | |
| ♂ (n=8) | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,3 |
| Allelfrequenz | 0,13 | 0 | 0 | 0,13 | 0,13 | 0,13 | 0,25 | 0,25 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| ♀ (n=24) | 1 | 0 | 1 | 1 | 3 | 6 | 5 | 4 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0,84 |
| Allelfrequenz | 0,04 | 0 | 0,04 | 0,04 | 0,13 | 0,25 | 0,20 | 0,17 | 0,04 | 0,04 | 0 | 0,04 | |
| Kontrollen (n= 204) | 5 | 0 | 16 | 3 | 24 | 49 | 56 | 28 | 12 | 5 | 4 | 2 | |
| Allelfrequenz | 0,02 | 0 | 0,08 | 0,01 | 0,12 | 0,24 | 0,27 | 0,14 | 0,06 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | |
| ♂ (n=104) | 2 | 0 | 6 | 2 | 10 | 30 | 33 | 7 | 8 | 4 | 1 | 1 | |
| Allelfrequenz | 0,02 | 0 | 0,06 | 0,02 | 0,10 | 0,29 | 0,32 | 0,07 | 0,08 | 0,04 | 0,01 | 0,01 | |
| ♀ (n=100) | 3 | 0 | 10 | 1 | 14 | 19 | 23 | 21 | 4 | 1 | 3 | 1 | |
| Allelfrequenz | 0,03 | 0 | 0,10 | 0,01 | 0,14 | 0,19 | 0,23 | 0,21 | 0,04 | 0,01 | 0,03 | 0,01 | |

n= Anzahl der Allele

4.1.3 Fall-Kontroll-Analyse zum Genotyp TGF α

Aufgrund der großen Anzahl unterschiedlicher Genotyp-Kombinationen aus TGF α - Δ 4bp- und D2S443-Ausprägungen und der in diesem Zusammenhang zu geringen Fallzahlen, wurde angesichts zu vieler schwach besetzter Tafeln auf eine statistische Analyse der Genotypen verzichtet.

Um festzustellen ob das seltene Allel Δ 4bp überzufällig häufig in Kombination mit bestimmten Allelen des Polymorphismus D2S443 auftritt, wurden nur die Proben einbezogen, welche mindestens ein deletiertes Allel am Locus TGF α - Δ 4bp aufwiesen. Bezugsgröße ist in diesem Fall also nicht die Personenanzahl, sondern die Anzahl der Allelkombinationen mit einem Allel Δ 4bp.

Die Kombination aus Allel Δ 4bp und dem Allel 9 bzw. 10 trat in keinem der beiden Kollektive auf. Die Häufigkeiten der ermittelten Kombinationen sind in Abbildung 12 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass in beiden Gruppen ähnliche Verteilungsmuster bestehen. So liegt die Kombination Δ 4bp mit den Allelen 14 bzw. 15 jeweils am

häufigsten vor. Auffällig ist, dass beide Patienten die die Mutation 18.1 im D2S443 aufweisen, auch Träger des seltenen $\Delta 4\text{bp}$ -Allels sind.

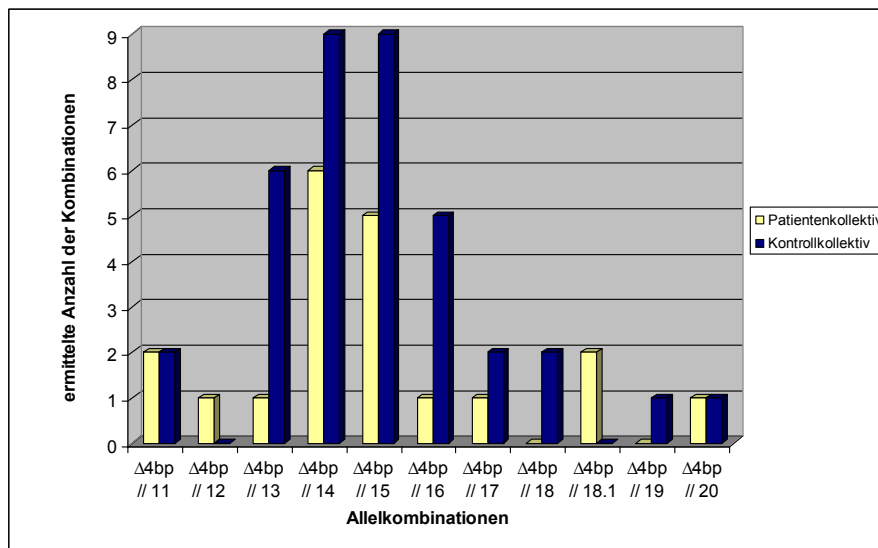


Abb. 12 Darstellung der in den Patienten- und Kontrollkollektiven ermittelten Allelkombinationen unter Trägern des seltenen $\Delta 4\text{bp}$ -Allels im Polymorphismus TGFα- $\Delta 4\text{bp}$ und den zugeordneten Allelgrößen im Polymorphismus D2S443 (geschlechts- und spaltartunabhängig)

Die statistische Analyse der Gesamtkollektive zeigt mit einem p-Wert von 0,43 keinen signifikanten Unterschied in der Verteilung der Allelkombinationen zwischen Patienten und Kontrollen. Auch nach getrennter Analyse von männlichen und weiblichen Probanden ergibt sich kein Hinweis auf eine Differenz (♂ p = 0,3, ♀ p = 0,73). Wird hinsichtlich der Spaltart untersucht, ergibt sich mit einem p-Wert von 0,43 (♂ p = 0,5, ♀ p = 0,76) auch für die Gruppe der LK±GS-Patienten keine Assoziation zwischen den TGFα-Polymorphismen und der Spaltbildung. Die einzelne Beurteilung des Kollektivs der Träger einer isolierten GS zeigt mit einem p-Wert von 0,27 ebenso kein Indiz für eine signifikante Assoziation. Einzig für die Subgruppe der männlichen GS-Träger konnte mit einem p-Wert von 0,006 bei der üblichen approximativen Berechnung des Chi-Quadrat-p-Wertes eine deutliche Signifikanz nachgewiesen werden. Es ist jedoch zu beachten, dass nur einer der männlichen GS-Patienten (Genotyp wt/ $\Delta 4\text{bp}$ //18.1/20) aufgrund seiner Deletion im TGFα- $\Delta 4\text{bp}$ in die Analyse einbezogen werden konnte. Um mit der geringen Fallzahl und Zellenbesetzung arbeiten zu können, wurde zusätzlich der quasi-exakte Test angewendet. Auch in diesem Fall ergibt sich mit einem p-Wert von 0,0155 eine Signifikanz. Auffällig dabei ist der hohe Beitrag der Kombinationen $\Delta 4\text{bp}$ //18.1 und $\Delta 4\text{bp}$ //20 zu Chi-Quadrat

($\Delta\text{Chi}^2 = 8,1$), was einen möglichen Einfluss der betreffenden Kombination auf die Erkrankungswahrscheinlichkeit impliziert.

4.2 Transforming Growth Factor beta 3 (TGF β 3)

4.2.1 Analyse des Polymorphismus TGF β 3- Δ 6bp

Der Längenpolymorphismus TGF β 3- Δ 6bp befindet sich in der 5'-untranslatierten Region des TGF β 3-Gens. Er ist durch eine Deletion der sechs Basenpaare „AGAGGG“ charakterisiert. Untersucht wurden 75 spalttragende Patienten (58 Träger einer LK \pm GS, 17 Träger einer isolierten GS) und 105 gesunde Kontrollen. In der Fragmentlängenanalyse stellt sich das Wildtyp-Allel durch ein 254bp langes Produkt dar, während das deletierte Allel 248bp aufweist. In Abbildung 13 wurde die Verteilung der Genotypen in den beiden Untersuchungsgruppen dargestellt. Der homozygote Wildtyp bildet mit Abstand den häufigsten Genotyp beider Kollektive. Unabhängig von Geschlecht und Spaltart, tritt eine ähnliche Verteilung der Genotypen auf, was sich auch durch eine statistische Analyse bestätigte ($p = 0,1$).

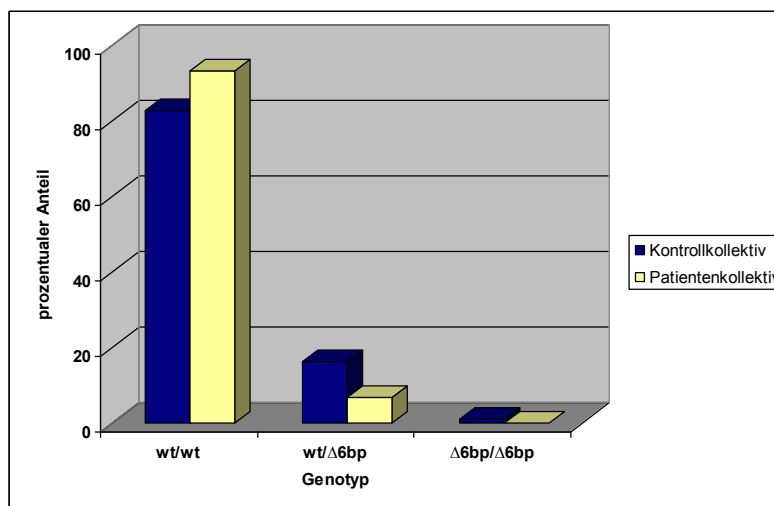


Abb. 13 Verteilung der Genotypen des Polymorphismus TGF β 3- Δ 6bp

4.2.1.1 Fall-Kontroll-Analyse zum Polymorphismus TGF β 3- Δ 6bp bei LK \pm GS-Patienten

Es wurden alle 58 Patienten mit LK \pm GS und 105 Kontrollen untersucht. Bei der Betrachtung der Genotypen fällt auf, dass in beiden Kollektiven der homozygote

Wildtyp, mit 93% der Patienten und 83% der Kontrollen, den bei weitem häufigsten Genotyp darstellt (vgl. Tab.4.5). Bei einem Probanden der Kontrollgruppe (K59) konnte homozygot das deletierte Allel nachgewiesen werden; in der Patientengruppe trat dies nicht auf. Es ist festzustellen, dass mit einer Allelfrequenz von 0,09 das seltene Allel $\Delta 6bp$ häufiger in dem Kontrollkollektiv zu finden ist, als unter den Patienten (Allelfrequenz 0,03). Vergleichbare Werte zeigen sich auch innerhalb der geschlechtsspezifischen Subpopulationen. Nichtsdestotrotz erbrachte die statistische Analyse mit einem p-Wert von 0,17 keinen signifikanten Unterschied bei der Allelverteilung zwischen den Kollektiven.

Tab. 4.5 Genotypenverteilung, Allelfrequenz des seltenen Allels innerhalb der untersuchten Gruppe sowie p-Werte für den Polymorphismus $TGF\beta 3-\Delta 6bp$ bei LK \pm GS-Patienten und Kontrollen

| Untersuchungs- kollektiv | Genotyp | | | Allelfrequenz des $\Delta 6bp$ - Allels | p-Wert |
|-----------------------------|---------|------------------|-------------------------|---|--------|
| | wt/wt | wt/ $\Delta 6bp$ | $\Delta 6bp/\Delta 6bp$ | | |
| Patienten (N= 58) | 54 | 4 | 0 | 0,03 | 0,17 |
| ♂ (N= 34) | 32 | 2 | 0 | 0,03 | 0,17 |
| ♀ (N= 24) | 22 | 2 | 0 | 0,04 | 0,71 |
| Kontrollen (N= 105) | 87 | 17 | 1 | 0,09 | |
| ♂ (N= 54) | 43 | 10 | 1 | 0,11 | |
| ♀ (N= 51) | 44 | 7 | 0 | 0,07 | |

N = Probandenanzahl; wt \triangleq 254 bp; $\Delta 6bp$ \triangleq 248bp

4.2.1.2 Fall-Kontroll-Analyse zum Polymorphismus $TGF\beta 3-\Delta 6bp$ bei Patienten mit isolierter GS

Auch innerhalb des Gaumenspalten-Kollektivs ist mit 94% der homozygote Wildtyp zugleich der häufigste Genotyp. Wie auch bei der LK \pm GS-Gruppe zu beobachten, tritt das deletierte Allel bei den GS-Patienten seltener auf als bei den Kontrollen (Tab. 4.6). Unter den männlichen Patienten war überhaupt kein $\Delta 6bp$ -Allel nachzuweisen. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass nur fünf der 17 GS-Träger männlich waren.

Weder für das gesamte GS-Kollektiv, noch für die geschlechtlich getrennt betrachteten Gruppen, konnte eine signifikante Differenz der Allelverteilung im Vergleich zum Kontrollkollektiv festgestellt werden (p-Wert für die Gesamtgruppen 0,49).

Tab. 4.6 Genotypenverteilung, Allelfrequenz des seltenen Allels innerhalb der untersuchten Gruppe sowie p-Werte für den Polymorphismus TGF β 3- Δ 6bp bei GS-Patienten und Kontrollen

| Untersuchungs- kollektiv | Genotyp | | | Allelfrequenz des Δ 6bp- Allels | p-Wert |
|-----------------------------|---------|------------------|----------------------------|--|--------|
| | wt/wt | wt/ Δ 6bp | Δ 6bp/ Δ 6bp | | |
| Patienten (N= 17) | 16 | 1 | 0 | 0,03 | 0,49 |
| ♂ (N= 5) | 5 | 0 | 0 | 0 | 0,54 |
| ♀ (N= 12) | 11 | 1 | 0 | 0,04 | 1 |
| Kontrollen (N= 105) | 87 | 17 | 1 | 0,09 | |
| ♂ (N= 54) | 43 | 10 | 1 | 0,11 | |
| ♀ (N= 51) | 44 | 7 | 0 | 0,07 | |

N = Probandenanzahl; wt \triangleq 254 bp; Δ 6bp \triangleq 248bp

4.2.2 Analyse des Substitutionspolymorphismus T \rightarrow C im Gen TGF β 3 (rs3917200)

Bei dem Polymorphismus rs3717200 handelt es sich um einen Substitutionspolymorphismus innerhalb des Intron 4 des TGF β 3-Gens. Er ist durch einen Einzelnukleotidaustausch T \rightarrow C an der Position -38 zum nächsten Intron/Exon-Übergang charakterisiert. Somit stellt sich der Wildtyp als homozygoter T-Allel dar. Es wurden 74 Patienten (57 mit LK \pm GS und 17 mit isolierter GS) und 103 Kontrollen hinsichtlich dieser Punktmutation untersucht. Abbildung 14 veranschaulicht die Verteilung der Genotypen. In beiden Kollektiven war der homozygote Wildtyp der am häufigsten zu findende Genotyp (bei den Kontrollen 87,4%, bei den Patienten 93,2%). Weder unter den Kontrollen noch unter den Patienten fand sich ein homozygoter Austausch von T \rightarrow C. Die statistische Analyse der Gesamtkollektive zeigt mit einem p-Wert von 0,31 keine signifikante Diskrepanz der Genotypenverteilung zwischen den untersuchten Gruppen. Auch hinsichtlich einer Unterscheidung nach Geschlecht ergibt sich keine statistisch messbare Differenz der Genotypenverteilung (♂ p = 1,0; ♀ p = 0,13).

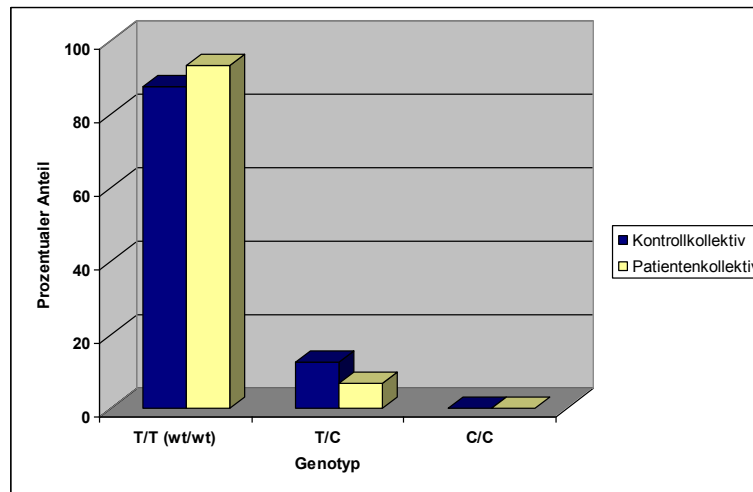


Abb. 14 Verteilung der Genotypen des Polymorphismus TGFβ3-rs3917200 innerhalb des Kontroll- bzw. Patientenkollektivs (unabhängig von Spaltart und Geschlecht)

4.2.2.1 Fall-Kontroll-Analyse zum Polymorphismus TGFβ3-rs3917200 bei LK±GS-Patienten

Es wurden 57 Patienten mit LK±GS und 103 Kontrollen auf den T→C Austausch untersucht. Nur vier der Patienten wiesen das substituierte Allel auf, wobei es sich ausschließlich um männliche Probanden handelte. In der Kontrollgruppe hingegen, lag die Allelfrequenz des seltenen Allels mit 0,07 bei den weiblichen Personen sogar leicht über der durchschnittlichen Frequenz innerhalb des Gesamtkollektivs (0,06). Die statistische Analyse erbrachte weder zwischen den Gesamtgruppen noch nach geschlechtlicher Trennung eine signifikante Differenz der Verteilung des homozygoten Wildtyps bzw. der heterozygoten Variante (vgl. Tab. 4.7).

Tab. 4.7 Genotypenverteilung, Allelfrequenz des seltenen Allels innerhalb der untersuchten Gruppe sowie p-Werte für den Polymorphismus TGFβ3-rs3917200 bei LK±GS-Patienten und Kontrollen

| Untersuchungs- kollektiv | Genotyp | | Allelfrequenz des C-Allels | p-Wert |
|-----------------------------|---------|-----|-------------------------------|--------|
| | T/T | T/C | | |
| Patienten (N=57) | 53 | 4 | 0,04 | 0,42 |
| ♂ (N=33) | 29 | 4 | 0,06 | 1 |
| ♀ (N=24) | 24 | 0 | 0 | 0,09 |
| Kontrollen (N=103) | 90 | 13 | 0,06 | |
| ♂ (N=52) | 46 | 6 | 0,06 | |
| ♀ (N=51) | 44 | 7 | 0,07 | |

N = Probandenanzahl; T ≙ wt; T/C ≙ heterozygoter Basenaustausch

4.2.2.2 Fall-Kontroll-Analyse zum Polymorphismus TGF β 3-rs3917200 bei Patienten mit isolierter GS

Unter den 17 Trägern einer isolierten Gaumenspalte fand sich nur eine (weibliche) Person, die eine heterozygote Substitution T \rightarrow C aufwies. Wie schon im LK \pm GS-Kollektiv konnte bei den Kontrollen mit 0,06 eine deutlich höhere Frequenz des seltenen C-Allels nachgewiesen werden als im Patientenkollektiv (0,03) (Vgl. Tab. 4.8). Dennoch wurde mittels statistischer Methoden keine signifikante Abweichung der Allelverteilung bzw. Allelhäufigkeiten festgestellt ($p = 0,69$).

Tab. 4.8 Genotypenverteilung, Allelfrequenz des seltenen Allels innerhalb der untersuchten Gruppe sowie p-Werte für den Polymorphismus TGF β 3-rs3917200 bei GS-Patienten und Kontrollen

| Untersuchungs-kollektiv | Genotyp | | Allelfrequenz des C-Allels | p-Wert |
|-------------------------|---------|-----|----------------------------|--------|
| | T/T | T/C | | |
| Patienten (N=17) | 16 | 1 | 0,03 | 0,69 |
| ♂ (N=5) | 5 | 0 | 0 | 1 |
| ♀ (N=12) | 11 | 1 | 0,04 | 1 |
| Kontrollen (N=103) | 90 | 13 | 0,06 | |
| ♂ (N=52) | 46 | 6 | 0,06 | |
| ♀ (N=51) | 44 | 7 | 0,07 | |

N = Probandenanzahl; T \triangleq wt; T/C \triangleq heterozygoter Basenaustausch

4.2.2.3 Analyse der Punktmutation -1G \rightarrow C

Während der Sequenzierung des TGF β 3-rs3917200-Fragmentes fiel bei einem weiblichen Patienten (P13-3) mit isolierter Gaumenspalte eine weitere heterozygote Punktmutation auf. Diese Transversion betrifft die letzte Base des Introns (Position - 1) und ist durch einen Austausch eines Guanins durch ein Cytosin charakterisiert. Da dieser Locus außerhalb der codierenden Sequenz liegt, folgt keine Veränderung der Aminosäuresequenz des TGF β 3-Gens. Diese Mutation konnte in keinem weiteren Patienten und keiner Kontrolle nachgewiesen werden. Eine Untersuchung des Vaters zeigte jedoch, dass auch dieser den beschriebenen SNP in heterozygoter Form aufweist (s. Abb. 15).

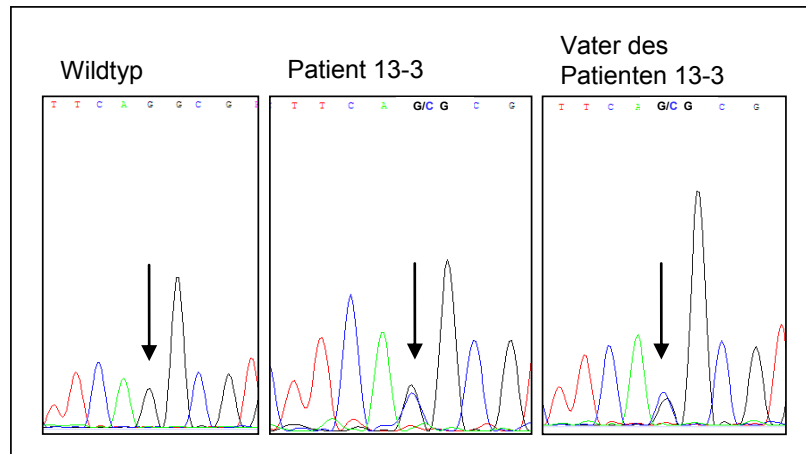


Abb. 15 Darstellung der Mutation -1G→C. Elektropherogramme einer Kontrollperson mit homozygotem Wildtyp -1G sowie der Patientenprobe P13-3 und der Probe des Vaters von P13-3, jeweils mit heterozygotem Basenaustausch -1G→C.

4.2.3 Fall-Kontroll-Analyse zum Genotyp TGFβ3

Um eine mögliche Häufung eines bestimmten Genotyps im Patientenkollektiv nachzuweisen, wurden die beiden Polymorphismen TGFβ3-Δ6bp und TGFβ3-rs3917200 in Kombination betrachtet. Mit ca. 71% unter den Kontrollen und ca. 86% unter den Patienten trat der Genotyp aus den homozygoten Wildtypallelen am weitaus häufigsten auf (Abb.16). Die Kombination aus einem homozygoten Wildtyplocus und einem heterozygoten Locus konnte in beiden Kollektiven nachgewiesen werden. Es fiel auf, dass nur ein Proband aus dem Kontrollkollektiv an beiden Loci die heterozygote Konstellation aufwies, also auch jeweils das seltene Allel beider Polymorphismen besitzt. Keiner der Patienten zeigte einen solchen kombinierten Genotyp. Aufgrund der ohnehin zum Teil gering besetzten Zellen der Kontingenztafel, wurde bei der statistischen Analyse auf eine Untergruppierung nach Geschlecht und Spaltart verzichtet und die Kollektive im Gesamten untersucht. Hinsichtlich der Gesamtkollektive ergab sich mit einem p-Wert von 0,16 keine signifikante Differenz in der Verteilung der Genotypen zwischen Patienten- und Kontrollgruppe. Somit ist nicht von einer Assoziation einer dieser kombinierten Genotypen zur Ausbildung von LKGS auszugehen.

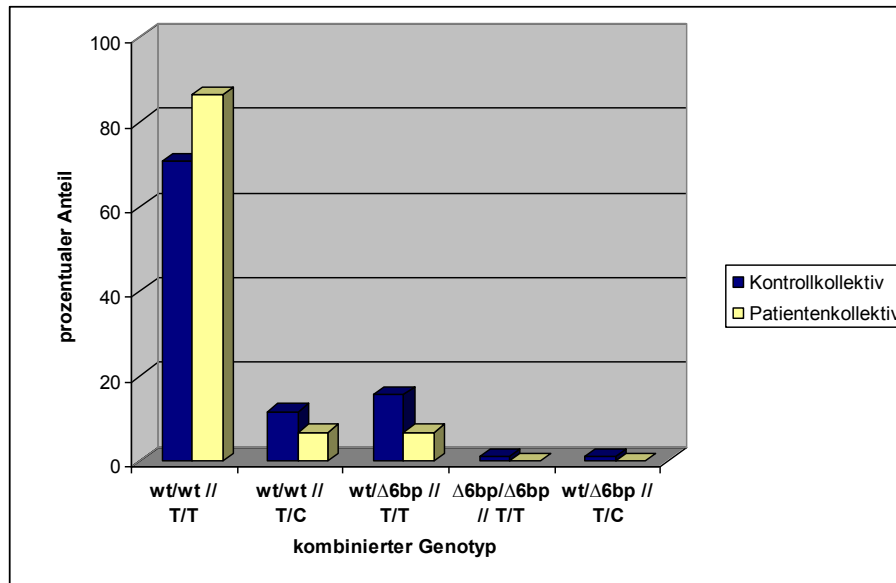


Abb. 16 Verteilung der Genotypen aus den Polymorphismen TGFβ3-Δ6bp und TGFβ3-rs3917200 in den Gesamtkollektiven für Kontrollen und Patienten. Dargestellt sind die prozentualen Verteilungen der aufgetretenen kombinierten Genotypen innerhalb der Kollektive. Die obere Zeile gibt den Genotyp im TGFβ3-Δ6bp an, während die zweite Zeile die Konstellation am Locus des Polymorphismus TGFβ3-rs3917200 aufzeigt. (T = wt, C = seltenes Allel)

4.3 Die Kombination der Polymorphismen im Bereich TGFα und TGFβ3

Es wurde gezielt nach einer möglichen Häufung von Kombinationen genetischer Variationen im Patientenkollektiv gesucht.

Nur bei einer Patientin (P49) traten sowohl das seltene Allel Δ4bp als auch das Δ6bp-Allel (in heterozygoter Form) auf. Dabei handelt es sich um eine Trägerin einer einseitigen LKGS. Dem gegenüber stehen drei Kontrollprobanden, welche Träger dieser Kombination sind. Daraus ergibt sich kein Hinweis auf eine Assoziation der Kombination der Polymorphismen TGFα-Δ4bp und TGFβ3-Δ6bp.

Weiterhin konnte anhand der fünf Träger des seltenen Allels Δ6bp und der fünf Träger des seltenen Allels C im Polymorphismus rs3717200 unter den Patienten keine augenscheinlich ausgeprägte Häufung einer Kombination mit einem bestimmten Genotyp des Polymorphismus D2S443 beobachtet werden. Die Frequenzen der aufgetretenen Einzelallele im D2S443 bei Trägern des Allels Δ6bp bzw. Allel C sind in etwa in beiden Kollektiven (Patienten/Kontrollen) vergleichbar.

Auffällig ist Kontrolle 59, welche Träger der triallelischen Mutation im D2S443 ist. Als Einzelfall im gesamten Untersuchungskollektiv konnte bei diesem männlichen

Probanden zusätzlich das deletierte Allel im Polymorphismus TGF β 3- Δ 6bp in homozygoter Form nachgewiesen werden.

Bei keinem der Patienten konnte die Kombination aus seltenem Allel Δ 4bp im TGF α und Allel C im TGF β 3 ermittelt werden. Im Kontrollkollektiv hingegen wies eine Testperson die homozygote Deletion 4bp und drei Probanden die heterozygote Deletion gemeinsam mit dem seltenen Allel C auf.

4.4 Forkhead-Box F2 (FOXF2)

Um Mutationen und Polymorphismen innerhalb des codierenden Bereiches des FOXF2-Gens zu finden, wurden beide Exons sowie die Exon/Intron-Übergänge sequenziert. Dabei ließen sich in beiden Exons Veränderungen nachweisen. Diese werden im Folgenden einzeln betrachtet. Alle Positionsangaben beziehen sich auf die Referenzsequenz NT_007592.15.

4.4.1 Polymorphismen des FOXF2-Gens (Exon 1)

4.4.1.1 Analyse des Polymorphismus rs78728576 - c.97GCC[9]+[10]

Bei diesem Polymorphismus handelt es sich um eine Insertion eines GCC-Repeats an Position g.1330279. In der Referenzsequenz finden sich an diesem Locus neun GCC-Wiederholungen (c.97GCC[9]). Auf der Proteinebene resultiert aus der Insertion eines zehnten GCC-Repeats ein zusätzliches Alanin innerhalb eines Alaninstretches; ohne Verschiebung des Leserahmens (s. Abb. 17).

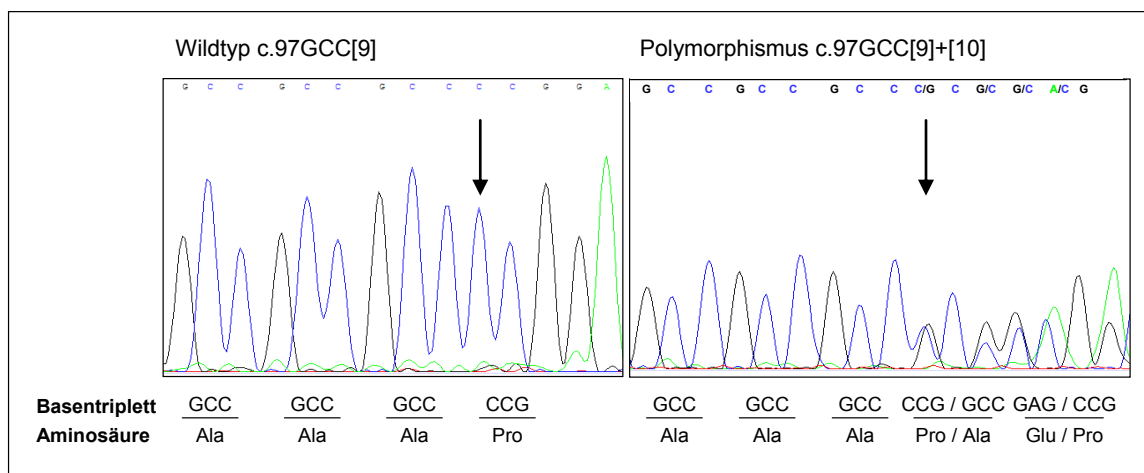


Abb. 17 Gegenüberstellung der Elektropherogramme einer Kontrollprobe (K4) mit homozygotem Wildtyp c.97GCC[9] und einer Probe (K17) mit heterozygoter Insertion c.97GCC[9]+[10].

Es konnte bei 65 Patienten (darunter 51 mit LK±GS und 14 mit isolierter Gaumenspalte) und 84 Kontrollen eine Analyse dieser Sequenz durchgeführt werden. Hier ließ sich bei vier Patienten und drei Kontrollen eine heterozygote Insertion eines GCC-Repeats beobachten (c.97GCC[9]+[10]). Eine homozygote Konstellation mit Insertion in beiden Allelen trat nicht auf. Abbildung 18 veranschaulicht, unabhängig von Geschlecht und Spaltart, die prozentuale Verteilung der Genotypen innerhalb der Kollektive. Mit einer Frequenz von 0,06 in der Patientengruppe und 0,04 innerhalb der Kontrollgruppe tritt die Insertion vergleichbar häufig auf. Auch die statistische Berechnung zeigte mit einem p-Wert von 0,7 keinen signifikanten Unterschied in der Allelverteilung.

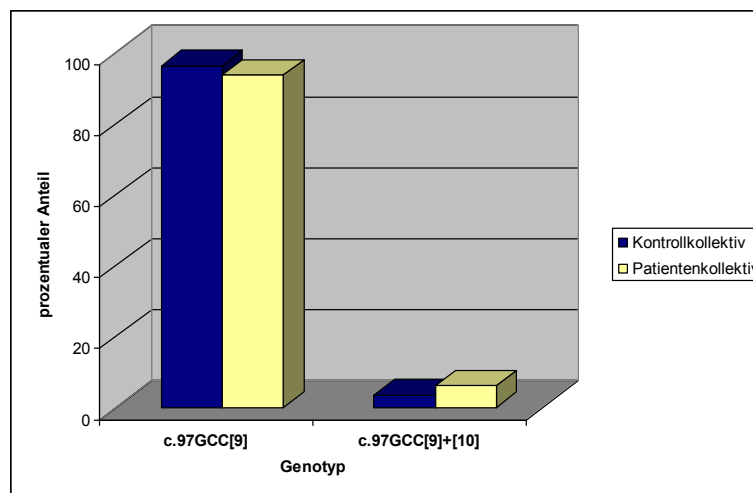


Abb. 18 Verteilung der Genotypen des Polymorphismus FOXF2-rs78728576

Unter den Kontrollen trat die Insertion nur bei männlichen Probanden auf; unter den vier insertionstragenden Patienten fanden sich hingegen drei weibliche. Trotz allem ergab die statistische Analyse auch hinsichtlich des Geschlechts keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe (♀ $p = 0,08$, ♂ $p = 0,63$).

Betrachtet man die zwei Subgruppen nach der Art der Spalten getrennt, zeigt sich, dass nur einer der Gaumenspaltpatienten (weiblich) diese Insertion aufweist. Der exakte Test nach Fisher ergab hier einen p-Wert von 0,47 und somit keinen Hinweis auf eine Assoziation der Insertion zur Entstehung von Gaumenspalten. Ähnlich stellten sich die Daten für die Gruppe der LK±GS-Patienten dar. Drei der 51 Betroffenen tragen ein zusätzliches GCC-Repeat. Der zugehörige p-Wert lag bei 0,67 und weist somit auch nicht auf einen signifikanten Unterschied zwischen Patienten- und Kontrollkollektiv hin.

4.4.1.2 Analyse der Punktmutation c.123C→T

An Position c.123 konnte in einer der 84 erfolgreich typisierten Kontrollproben (K89) eine heterozygote Sequenzvariation gefunden werden (s. Abb. 19). Hierbei handelt es sich um einen Einzelbasenaustausch C→T im letzten GCC-Repeat des zuvor beschriebenen Alaninstretches (vgl. 4.3.1.1).

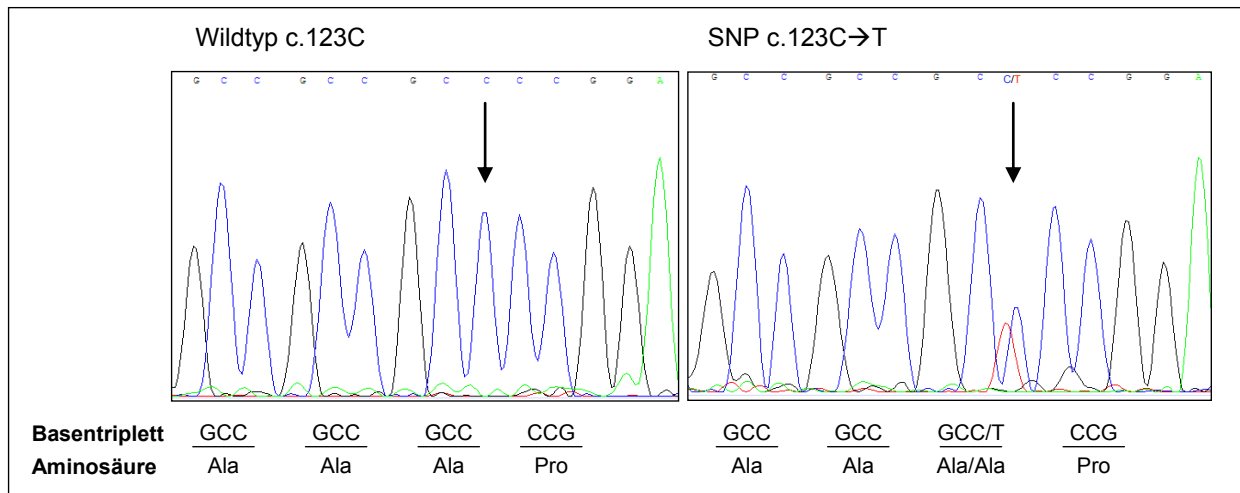


Abb. 19 Gegenüberstellung der Elektropherogramme einer Kontrollprobe (K4) mit homozygotem Wildtyp c.123C und der Kontrollprobe K89 mit heterozygoter Variation c.123C→T.

4.4.1.3 Analyse des Polymorphismus rs72667003 – c.262G→A

Ein Basenaustausch Guanin zu Adenin konnte an Position c.262 ermittelt werden (siehe Abb. 20). Zwei der 73 erfolgreich analysierten Patienten (56 Träger einer LK±GS, 17 Träger einer isolierten GS) und 10 der 102 Kontrollen wiesen diesen Polymorphismus in heterozygoter Form auf. Nur bei einer Kontrollprobe (K7) trat das seltene Allel A in homozygoter Weise auf. Somit liegt die Allelfrequenz des seltenen A-Allels mit 0,06 bei den Kontrollen deutlich höher als bei den Patienten (0,014).

Die statistische Auswertung der Allelverteilung innerhalb der vorliegenden Kollektive ergab mit einem p-Wert von 0,13 jedoch keine signifikante Differenz. Gleiches gilt für die getrennte Betrachtung der männlichen ($p = 0,14$) und weiblichen ($p = 0,39$) Probanden.

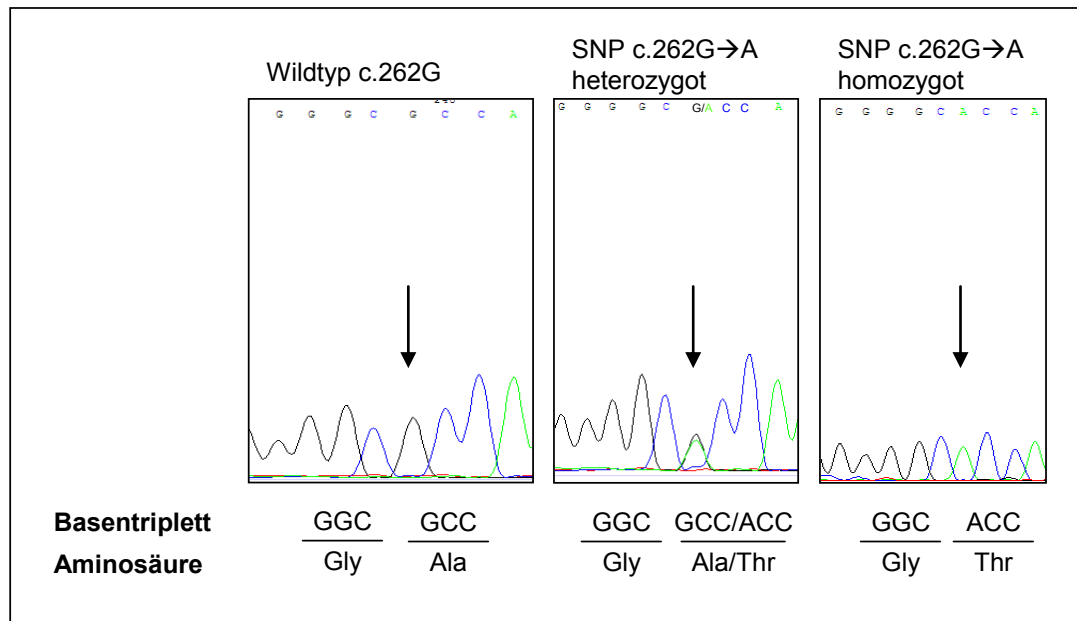


Abb. 20 Gegenüberstellung der Elektropherogramme einer Probe (K9) mit homozygotem Wildtyp c.262G, einer Probe (K34) mit heterozygoter Variation c.262G→A und einer Probe (K7) mit homozygot seltenem Allel A (c.262A).

Die beiden Patienten, welche den Polymorphismus aufwiesen, sind Träger einer LK±GS; unter den Betroffenen einer isolierten Gaumenspalte konnte keine Veränderung dieses Locus' nachgewiesen werden. Aufgrund der geringen Fallzahlen polymorphismustragender Patienten wurde auf eine statistische Analyse der Allelhäufigkeiten in den Subgruppen isolierte GS und LK±GS verzichtet.

4.4.1.4 Analyse der Punktmutation c.344G→A

Eine der Patientinnen (P13-3) mit isolierter Gaumenspalte zeigte an Position c.344 einen weiteren heterozygoten Basenaustausch. Auch hierbei handelt es sich um eine Substitution der Base Guanin durch Adenin. Daraus folgt eine Veränderung des Basentriplets von AGC zu AAC (s. Abb. 21). Zu dieser Patientin stand DNA-fähiges Material beider Eltern zur Verfügung. Beide wiesen an diesem Locus homozygot nur das Wildtyp-Allel auf. Somit muss es sich bei Patientin 13-3 um eine Neumutation handeln.

Diese missense Mutation konnte bei keiner der Kontrollen nachgewiesen werden.

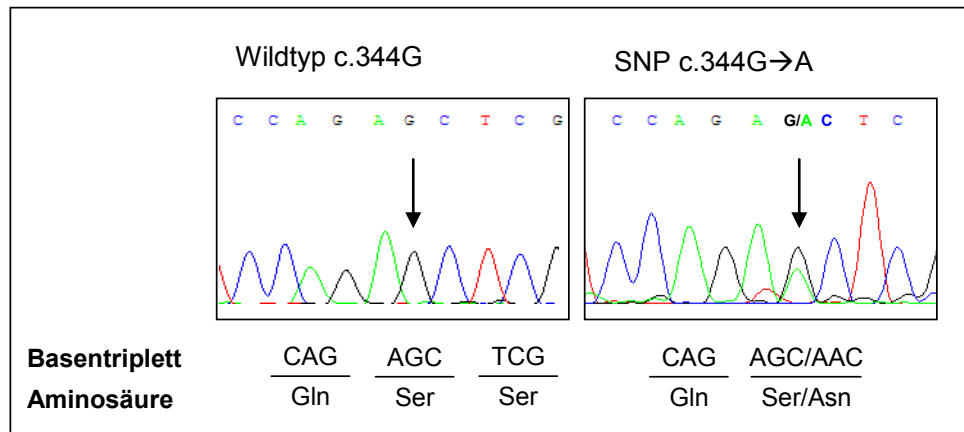


Abb. 21 Gegenüberstellung der Elektropherogramme einer Kontrollperson (K4) mit homozygotem Wildtyp c.344G und der Patientenprobe P13-3 mit heterozygoter Variation c.344G→A.

4.4.1.5 Analyse des Polymorphismus rs34317327/rs58230522 - c.904GGC[5]+[6]

Bei diesem Polymorphismus handelt es sich um einen Längenpolymorphismus an Position c.904 des Exon 1. Die Referenzsequenz weist ab dieser Stelle fünf GGC-Repeats auf. Die Sequenzanalyse von 70 LKGS-Patienten hat ergeben, dass in ca. 40% der Fälle eine heterozygote Insertion eines sechsten GGC-Triplets vorliegt. Unter den 97 Kontrollen konnte sogar in 52% der Probanden ein heterozygoter Genotyp festgestellt werden. Die homozygote Konstellation mit zwei Insertionsallelen trat mit ca. 26% der Patienten und ca. 20% der Kontrollen ähnlich häufig auf wie der Wildtyp ohne Insertion (vgl. Abb. 22).

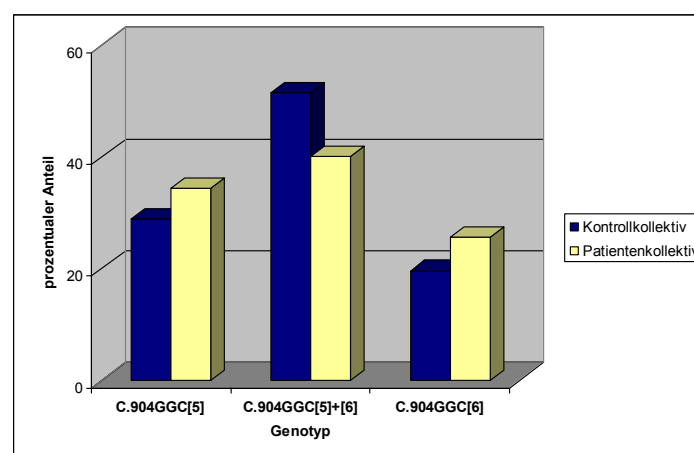


Abb. 22 Verteilung der Genotypen des Polymorphismus FOXF2- c.904GGC[5]+[6]

Tabelle 4.9 verdeutlicht die Verteilung der Allele innerhalb der Kollektive und geschlechtsspezifischen Untergruppen. Es finden sich keine Unterschiede in der

Häufigkeit des Auftretens des sechsten GGC-Repeats. Dies spiegelt sich auch in den berechneten p-Werten wider, welche keinen Hinweis auf eine Signifikanz geben.

Tab. 4.9 Genotypenverteilung, Allelfrequenz des seltenen Allels innerhalb der untersuchten Gruppe sowie p-Werte für den Polymorphismus FOXF2- c.904GGC[5]+[6] bei LKGS-Patienten und Kontrollen (unabhängig von der Spaltart)

| Untersuchungs-kollektiv | Genotyp | | | Allelfrequenz des 6.GGC-Allels | p-Wert |
|-------------------------|-------------|-----------------|-------------|--------------------------------|--------|
| | C.904GGC[5] | C.904GGC[5]+[6] | C.904GGC[6] | | |
| Patienten (N= 70) | 24 | 28 | 18 | 0,46 | 0,33 |
| ♂ (N=38) | 13 | 16 | 9 | 0,44 | 0,29 |
| ♀ (N=32) | 11 | 12 | 9 | 0,47 | 0,86 |
| Kontrollen (N=97) | 28 | 50 | 19 | 0,45 | |
| ♂ (N=51) | 13 | 30 | 8 | 0,45 | |
| ♀ (N=46) | 15 | 20 | 11 | 0,46 | |

N = Probandenanzahl

Auch unter Berücksichtigung der Spaltart zeigt sich keine Umverteilung der Frequenzen. In Tabelle 4.10 ist ersichtlich, dass auch innerhalb der Subpopulationen nahezu jedes zweite Allel die Insertion eines sechsten Repeats aufweist.

Tab. 4.10 Genotypenverteilung, Allelfrequenz des seltenen Allels innerhalb der untersuchten Gruppe sowie p-Werte für den Polymorphismus FOXF2- c.904GGC[5]+[6] bei LK±GS-Patienten, Patienten mit isolierter GS und Kontrollen

| Untersuchungs-kollektiv | Genotyp | | | Allelfrequenz des 6.GGC-Allels | p-Wert |
|-------------------------|-------------|-----------------|-------------|--------------------------------|--------|
| | C.904GGC[5] | C.904GGC[5]+[6] | C.904GGC[6] | | |
| LK±GS-Patienten (N=54) | 19 | 21 | 14 | 0,45 | 0,32 |
| ♂ (N=33) | 12 | 13 | 8 | 0,44 | 0,22 |
| ♀ (N=21) | 7 | 8 | 6 | 0,48 | 0,89 |
| GS-Patienten (N=16) | 5 | 7 | 4 | 0,47 | 0,82 |
| ♂ (N=5) | 1 | 3 | 1 | 0,5 | 0,95 |
| ♀ (N=11) | 4 | 4 | 3 | 0,45 | 0,91 |
| Kontrollen (N=97) | 28 | 50 | 19 | 0,45 | |
| ♂ (N=51) | 13 | 30 | 8 | 0,45 | |
| ♀ (N=46) | 15 | 20 | 11 | 0,46 | |

Abbildung 23 zeigt die Veränderung des Elektropherogramms einer Probe mit zusätzlichem Repeat in heterozygoter und homozygoter Form.

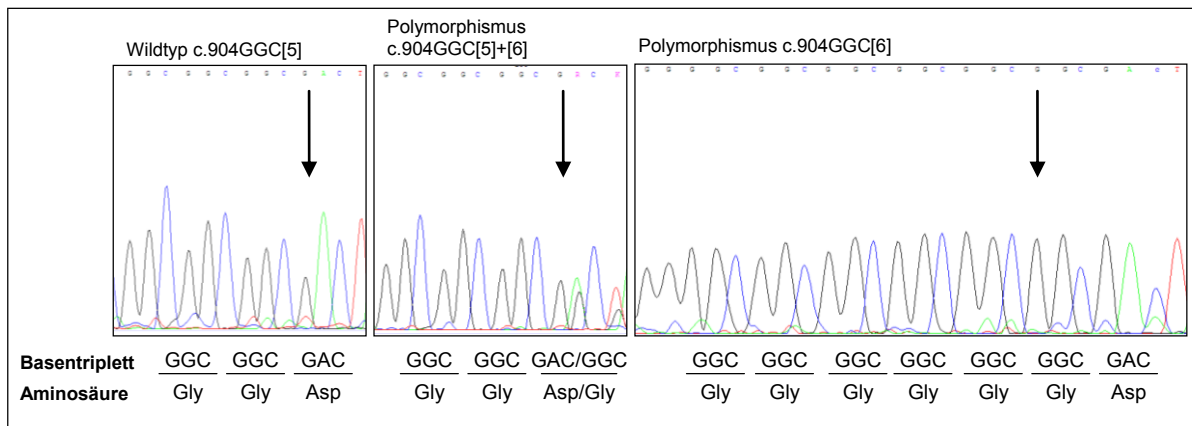


Abb. 23 Gegenüberstellung der Elektropherogramme der Probe P76 mit homozygotem Wildtyp c.904GGC[5], der Probe 74-3 mit heterozygoter Variation c.904GGC[5]+[6] sowie der Probe P24 mit homozygoten Insertion c.904GGC[6]

4.4.2 Polymorphismen des FOXF2-Gens (Exon 2)

4.4.2.1 Analyse der Punktmutation c.1177C→A

An Position c.1177 des zweiten Exons wurde bei einem der 75 untersuchten Patienten (P43) ein heterozygoter Basenaustausch C→A nachgewiesen. Dieser Proband ist Träger einer beidseitigen LKGS. Wie in Abbildung 24 dargestellt, folgt aus der Transversion eine Veränderung des Basentriplets von CTG zu ATG. Diese missense Mutation konnte bei keiner der 104 getesteten Kontrollpersonen gefunden werden.

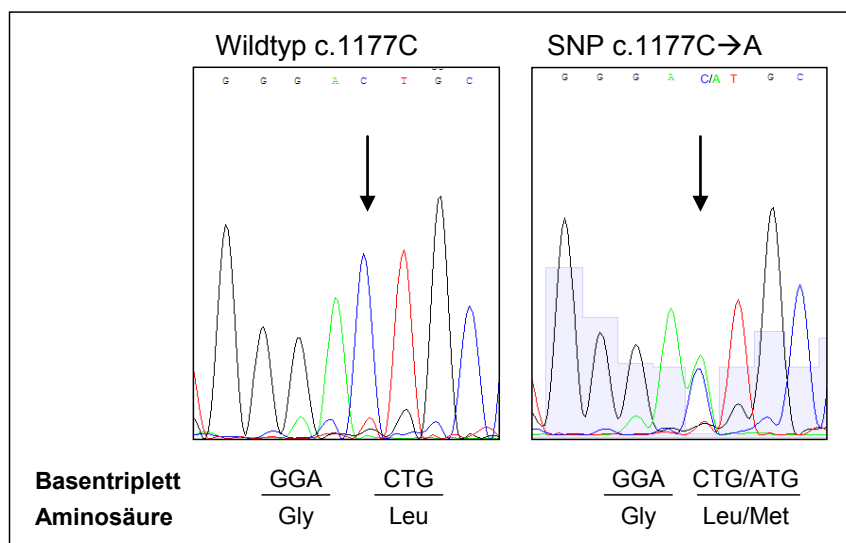


Abb. 24 Gegenüberstellung der Elektropherogramme der Kontrollperson (K83) mit homozygotem Wildtyp c.1177C und der Patientenprobe P43 mit heterozygoter Variation c.1177C→A.

4.4.2.2 Analyse der Punktmutation c.1272C→T

In der Sequenz des zweiten Exons konnte für zwei der 104 Kontrollproben ein weiterer SNP identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um einen heterozygoten Austausch eines Cytosins gegen ein Thymin an Position c.1272 (s. Abb. 25). Somit wird die dritte Base im codierenden Triplet ausgetauscht. Diese Mutation konnte bei keinem der 75 Patienten nachgewiesen werden. In beiden betroffenen Fällen trat zusätzlich zu dieser Punktmutation ein weiterer, nahe gelegener Polymorphismus auf. Hier erfolgte ein Basenaustausch T→C an Position c.1284 (näher beschrieben in Kapitel 4.4.2.3). In beiden Fällen handelt es sich um gesunde Kontrollpersonen, so dass auch die Kombination aus beiden Mutationen keinen Hinweis auf eine Assoziation zur Ausbildung von LKGS gibt.

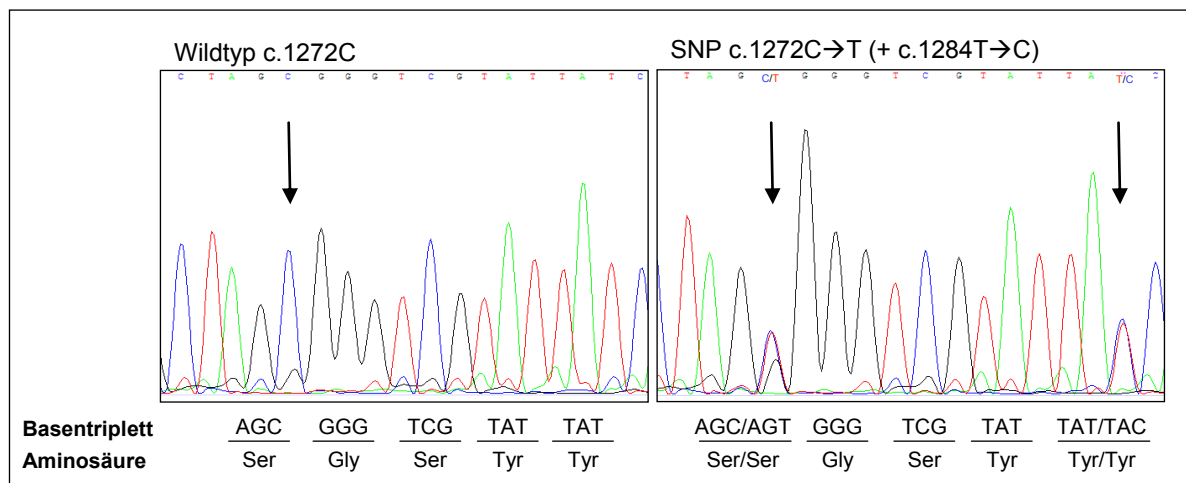


Abb. 25 Gegenüberstellung der Elektropherogramme einer Kontrollperson (K83) mit homozygotem Wildtyp c.1272C und einer Kontrollprobe (K14) mit heterozygoter Variation c.1272C→T sowie c.1284T→C.

4.4.2.3 Analyse des Polymorphismus rs2293783 – c.1284T→C

Der SNP rs2293783 befindet sich an Position c.1284 des FOXF2-Gens. Er ist durch einen Einzelnukleotidaustausch Thymin durch Cytosin gekennzeichnet (vgl. Abb. 26) und tritt sowohl in heterozygoter als auch homozygoter Form auf.

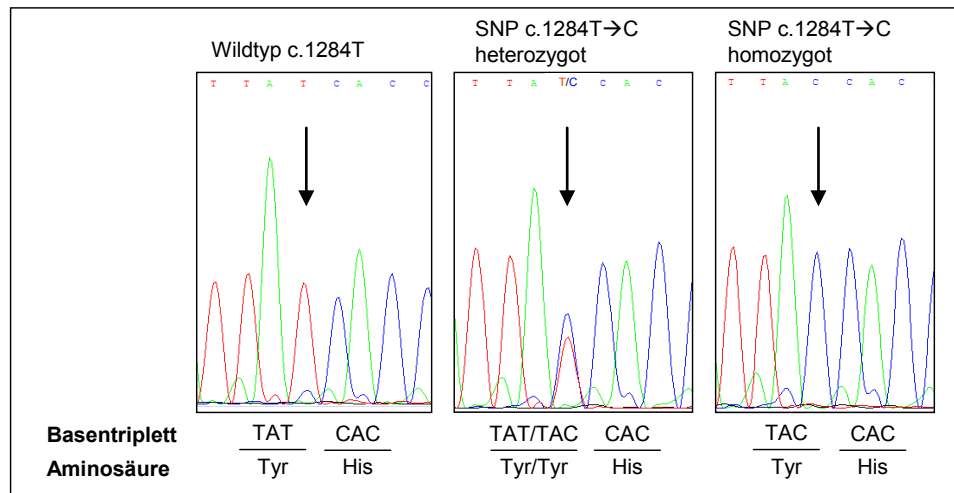


Abb. 26 Gegenüberstellung der Elektropherogramme einer Kontrollperson (K57) mit homozygotem Wildtyp c.1284T und jeweils einer Kontrollprobe mit heterozygoter Variation c.1284T→C (K28) und homozygoter Form c.1284C (K48).

Insgesamt konnten 75 Patienten und 104 Kontrollen hinsichtlich dieses Polymorphismus' untersucht werden. Die geschlechts- und spaltartunabhängige Verteilung der Genotypen innerhalb der Kollektive ist in Abb. 27 dargestellt. Der homozygote Wildtyp (T/T) tritt mit jeweils über 60% in beiden Gruppen als häufigster Genotyp auf. Die heterozygote Variante C/T kommt mit 34% bei den Kontrollen etwas häufiger vor als in der Patientengruppe (29%). Die homozygote Form mit zwei seltenen Cytosin-Allelen tritt hingegen bei den Patienten mehr als doppelt so häufig auf wie bei den Kontrollen. Die statistische Berechnung lässt jedoch mit einem p-Wert von 0,83 keinen signifikanten Unterschied in der Verteilung der drei Ausprägungen zwischen den Kollektiven erkennen. Auch die getrennte Betrachtung der männlichen und weiblichen Probanden gibt keinen Hinweis auf eine Assoziation des Polymorphismus' zur Ausbildung von LKGS (♂ p = 0,65, ♀ p = 0,19).

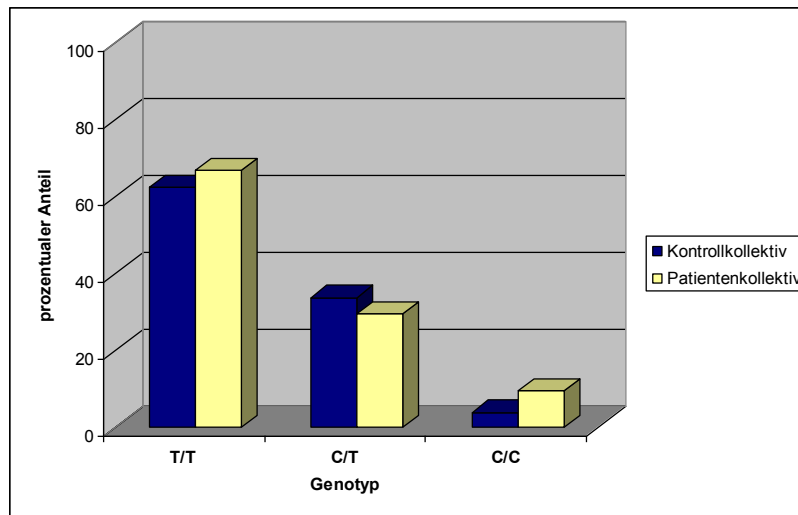


Abb. 27 Verteilung der Genotypen des Polymorphismus FOXF2-rs2293783 innerhalb des Kontroll- bzw. Patientenkollektivs (unabhängig von Spaltart und Geschlecht)

Betrachtet man in Tabelle 4.11 die zwei Subpopulationen, hinsichtlich ihrer Spaltarten getrennt, wird ersichtlich, dass das seltene Allel C mit einer Frequenz von 0,09 seltener in der Gruppe der Gaumenspalträger zu finden ist als unter den Betroffenen mit einer LK±GS (0,22). Unter den Kontrollen ist das seltene Allel in etwa gleich häufig anzutreffen wie bei den LK±GS-Patienten. Trotz allem zeigt die statistische Analyse für keine der Subgruppen im Vergleich zum Kontrollkollektiv einen signifikanten Unterschied in der Verteilung der Genotypen.

Tab. 4.11 Genotypenverteilung, Allelfrequenz des seltenen Allels innerhalb der untersuchten Gruppe sowie p-Werte für den Polymorphismus FOXF2-rs2293783 bei LK±GS-Patienten, Patienten mit isolierter GS und Kontrollen

| Untersuchungs- kollektiv | Genotyp | | | Allelfrequenz des seltenen C-Allels | p-Wert |
|-----------------------------|---------|-----|-----|---|--------|
| | T/T | C/T | C/C | | |
| LK±GS-Patienten (N=58) | 36 | 19 | 3 | 0,22 | 0,92 |
| ♂ (N=34) | 17 | 14 | 3 | 0,29 | 0,55 |
| ♀ (N=24) | 19 | 5 | 0 | 0,1 | 0,46 |
| GS-Patienten (N=17) | 14 | 3 | 0 | 0,09 | 0,26 |
| ♂ (N=5) | 3 | 2 | 0 | 0,2 | 0,91 |
| ♀ (N=12) | 11 | 1 | 0 | 0,04 | 0,25 |
| Kontrollen (N=104) | 65 | 35 | 4 | 0,21 | |
| ♂ (N=54) | 31 | 21 | 2 | 0,23 | |
| ♀ (N=50) | 34 | 14 | 2 | 0,18 | |

N = Probandenanzahl

4.4.2.4 Analyse des Polymorphismus rs45600838 – *25G → A

Ein weiterer Polymorphismus konnte im nicht-codierenden 3'-UTR-Bereich des FOXF2-Gens ermittelt werden. Hierbei findet ein heterozygoter Einzelnukleotidaustausch G → A an Position *25 statt (s. Abb. 28). Da es sich um den nicht-translatierten Bereich handelt, folgt keine Veränderung der Aminosäuresequenz.

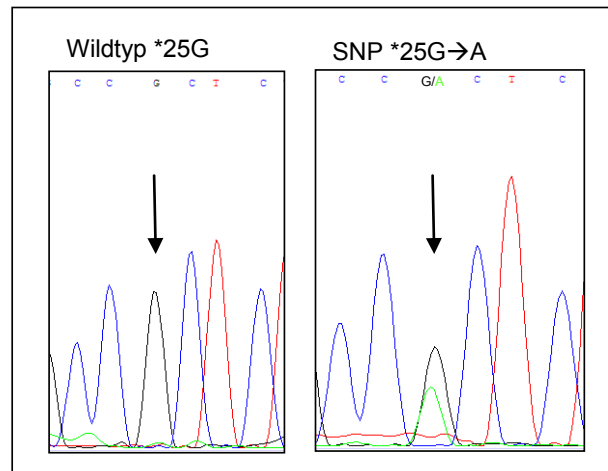


Abb. 28 Gegenüberstellung der Elektropherogramme einer Kontrollperson (K1) mit homozygotem Wildtyp *25G und einer Kontrollprobe (K83) mit heterozygoter Variation *25G → A in der 3'-UTR des FOXF2-Gens.

Insgesamt wiesen zwei der 75 Patienten und fünf der 104 Kontrollen diesen Polymorphismus auf. Aufgrund der geringen Probenanzahl polymorphismustragender Personen wurde keine statistische Analyse durchgeführt.

4.4.3 Fall-Kontroll-Analyse zum Genotyp FOXF2

Insgesamt konnte für 64 Patienten und 84 Kontrollen der gesamte Bereich sequenziert werden und somit ein kombinierter Genotyp erstellt werden. Anhand der insgesamt neun im FOXF2-Genbereich festgestellten Variationen können zahlreiche zusammengesetzte Genotypen ermittelt werden. Ca. 23% der Patienten und 21% der Kontrollen wiesen den reinen Wildtyp auf, das heißt die Sequenzen entsprachen genau der Referenzsequenz. Bei keiner der untersuchten Personen konnten mehr als drei Polymorphismen nachgewiesen werden. Betrachtet man die beiden Längenpolymorphismen rs78728576 und rs34317327 fällt auf, dass nur bei einem der Patienten an beiden Loci ein zusätzliches Triplet zu ermitteln war. Bei den

Kontrollen lagen hingegen bei allen drei Trägern der Insertion am ersten Locus auch am zweiten die zusätzlichen Nukleotide vor. Diese drei Kontrollpersonen wiesen weiterhin auch eine heterozygote Konstellation am Locus rs2293783 des zweiten Exons auf. Wobei wiederum keiner der Patienten mit Insertion am Locus rs78728576 einen weiteren Polymorphismus zeigte.

Die beiden Patienten, die am Locus rs72667003 (c.262) eine heterozygote Konstellation erkennen ließen, sind gleichzeitig Träger einer homozygoten Insertion am Längenpolymorphismus rs34317327 (c.904). Diese Kombination konnte auch bei zwei der Kontrollen nachgewiesen werden, wobei drei weitere Kontrollprobanden den SNP in Verbindung mit dem heterozygoten Genotyp c.904GGC[5]+[6] besitzen.

In beiden Kollektiven traten gehäuft nur die beiden Polymorphismen rs34317327 im Exon 1 und rs2293783 (c.1284) im Exon 2 auf. Um statistisch aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, wurden daher nur die Genotypkombinationen dieser beiden Loci in die Berechnung mittels quasi-exakten Tests einbezogen. Anhand der DNA von 97 Kontrollen und 70 Patienten konnte die Verteilung der Genotypkombinationen verglichen werden. Diese ist in Abbildung 29 dargestellt. Es zeigt sich ein ähnliches Verteilungsmuster innerhalb der Gruppen, wobei bei den Patienten der WT an beiden Loci die häufigste Ausprägungsform darstellt (ca. 33%), während unter den Kontrollen die Kombination aus GCC-Insertion im ersten Exon und WT im zweiten Exon am häufigsten auftritt (ca. 31%). Der Genotyp c.904GGC[6] // c.1284C mit zwei homozygoten Polymorphismen kommt in beiden Gruppen nur selten vor; mit über 4% jedoch unter den Patienten doppelt so oft wie im Kontrollkollektiv. Trotzdem erbrachte die statistische Analyse mit einem p-Wert von 0,64 keinen Hinweis auf eine Assoziation zwischen einer Kombination dieser Polymorphismen und der Ausbildung von LKGS. Auch hinsichtlich der Geschlechter betrachtet, wurde kein statistisch signifikanter Wert für eine Verschiebung der Genotypverteilung festgestellt (♂ p = 0,46; ♀ p = 0,59).

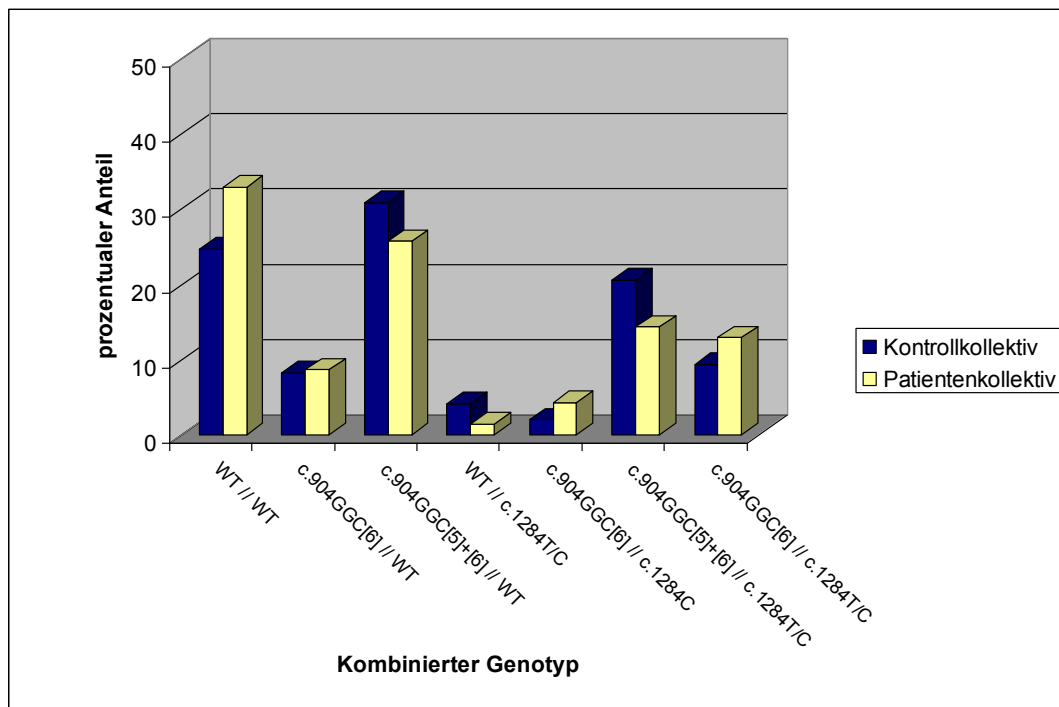


Abb. 29 Verteilung der Genotypen aus den Polymorphismen FOXF2-rs34317327 und rs2293783 in den Gesamtkollektiven für Kontrollen und Patienten. Dargestellt sind die prozentualen Verteilungen der aufgetretenen kombinierten Genotypen innerhalb der Kollektive. Der Wildtyp (WT) am ersten Locus bezeichnet den Genotyp c.904GGC[5], der WT am zweiten Locus entspricht c.1284T.

Werden die Untergruppen nach Spaltarten und Geschlecht getrennt analysiert, zeigt sich ebenso kein statistischer Hinweis für eine Assoziation. Wie in Tabelle 4.12 erkennbar, kommen zwar Schwankungen in der Genotypfrequenz zwischen den unterschiedlichen Subpopulationen vor, aber in der Gesamtschau stellt sich kein signifikanter Unterschied in der Genotypverteilung dar.

Tab. 4.12 Genotypenverteilung, Genotypfrequenz (in Klammern) innerhalb der angegebenen Gruppe sowie p-Werte für die Kombination der Polymorphismen FOXF2-rs34317327 und rs2293783 bei LK±GS-Patienten, Patienten mit isolierter GS und Kontrollen

| Untersuchungs-kollektiv | kombinierter Genotyp aus FOXF2-rs34317327 und rs2293783 | | | | | | | p-Wert |
|---------------------------|---|--------------------------|-----------------------------|---------------------------|----------------------|--------------------|-----------|-------------|
| | c.904GGC[5]+[6] // c.1284T/C | c.904GGC[5]+[6] // WT | c.904GGC[6] // c.1284T/C | c.904GGC[6] // c.1284C | c.904GGC[6] // WT | WT // c.1284T/C | WT // WT | |
| LK±GS-Patienten (N=54) | 9 (0,17) | 12 (0,22) | 7 (0,13) | 3 (0,06) | 4 (0,07) | 1 (0,02) | 18 (0,33) | 0,63 |
| ♂ (N=33) | 7 (0,21) | 6 (0,18) | 5 (0,15) | 3 (0,09) | 0 (0) | 1 (0,03) | 11 (0,33) | 0,36 |
| ♀ (N=21) | 2 (0,1) | 6 (0,29) | 2 (0,1) | 0 (0) | 4 (0,19) | 0 (0) | 7 (0,33) | 0,85 |
| GS-Patienten (N=16) | 1 (0,06) | 6 (0,38) | 2 (0,13) | 0 (0) | 2 (0,13) | 0 (0) | 5 (0,31) | 0,75 |
| ♂ (N=5) | 1 (0,2) | 2 (0,4) | 1 (0,2) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 1 (0,2) | 0,95 |
| ♀ (N=11) | 0 (0) | 4 (0,36) | 1 (0,09) | 0 (0) | 2 (0,18) | 0 (0) | 4 (0,36) | 0,79 |
| Kontrollen (N=97) | 20 (0,21) | 30 (0,31) | 9 (0,09) | 2 (0,02) | 8 (0,08) | 4 (0,04) | 24 (0,25) | |
| ♂ (N=51) | 14 (0,27) | 16 (0,31) | 5 (0,1) | 1 (0,02) | 2 (0,04) | 1 (0,02) | 12 (0,23) | |
| ♀ (N=46) | 6 (0,13) | 14 (0,3) | 4 (0,09) | 1 (0,02) | 6 (0,13) | 3 (0,07) | 12 (0,26) | |

N = Probandenanzahl

4.4.4 Zusammenfassung der ermittelten genetischen Varianten im Bereich des FOXF2-Gens

Im Gesamtkollektiv der in der vorliegenden Studie untersuchten Probanden konnten neun Abweichungen zur Referenzsequenz gefunden werden. Acht Veränderungen wurden in der codierenden Sequenz nachgewiesen. Die Intron/Exon-Übergänge entsprachen, bis auf den Polymorphismus rs45600838 innerhalb der 3'-Untranslatierten Region, der Referenzsequenz.

In Abbildung 30 sind die ermittelten Varianten in der Sequenz des FOXF2-Gens und den umgebenden Bereichen dargestellt. Außerdem wurden funktionell wichtige Sequenzbereiche wie die Forkhead-Box und Splice-Sites markiert (nach Blixt et al. 1998 bzw. Hellqvist et al. 1998).

[...]CGGGCGGGCGGGCTAGGGCGCTCGCAGGGCTTCTGGGCGGACCCCGCTCCGGCGCCTCCGC
TTCCCCGCCCCGGGGCCCCGCCCTCGCGGCCCGGCCCTCGCTCCCGGGTCCCAG → Beginn Exon 1

```

1      ATG ACC ACC GAG GGC GGG CCG CCG CCG GCC CCG CTC CGC CGC GCG TGC AGC
52     CCG GTC CCC GGC GCG CTC CAG GCC GCC CTG ATG AGC CCG CCG CCC GCC GCC
103    GCC GCC GCC GCC GCC GCC GCG CCG GAG ACC ACC TCC TCC TCC TCG TCG TCG
154    TCC TCC GCC TCC TGC GCC TCG TCC TCG TCC TCC TCC AAT TCG GCC AGC GCC
205    CCC TCG GCT GCC TGC AAG AGC GCG GGC GGC GGC GGC GCG GGC GCC GGG AGC
256    GGG GGC GGC AAG AAG GCG AGC TCG GGG CTG CGG CGG CCC GAG AAG CCG CCC
307    TAC TCG TAC ATC GCG CTC ATC GTC ATG GCC ATC CAG AAG CCG CCC AGC AAG
358    CGC CTG ACG CTC AGC GAG ATC TAC CAG TTC CTG CAG GCG CGC TTC CCC TTC
409    TTC CGC GGC GCC TAC CAG GGC TGG AAG AAC TCG GTG CGC CAC AAT CTC TCG
460    CTC AAC GAG TGC TTC ATC AAG CTG CCT AAG GGC CTC GGG CGG CCC GGC AAG
511    GGC CAC TAC TGG ACC ATC GAC CCG GCC AGC GAG TTC ATG TTC GAG GAG GGC
562    TCG TTC CGC CGC CGG CCG CGC GGC TTC AGG CGG AAG TGC CAG GCG CTC AAG
613    CCC ATG TAC CAC CGC GTG GTG AGC GGC TTG GGC TTC GGG GCG TCG CTG CTG
664    CCC CAG GGC TTC GAC TTC CAG GCG CCC CCG TCG GCG CCG CTC GGC TGC CAC
715    AGC CAG GGC GGC TAC GGC GGC CTC GAC ATG ATG CCC GCG GGC TAC GAC GCC
766    GGC GCG GGC GCC CCC AGC CAC GCG CAC CCT CAC CAC CAC CAC CAC CAC CAC
817    GTC CCG CAC ATG TCG CCC AAC CCG GGT TCC ACC TAC ATG GCC AGC TGC CCG
868    GTG CCC GCG GGA CCC GGG GGC GTC GGT GCG GCC GGG GGC GGC GGC GGC GGC
919    GAC TAC GGG CCG GAC AGC AGC AGC AGC CCG GTA CCC TCG TCC CCG GCC ATG
970    GCG AGC GCC ATC GAA TGC CAC TCG CCC TAC ACG AGC CCT GCG GCG CAC TGG
1021   AGC TCG CCT GGC GCC TCG CCT TAC CTC AAG CAG CCG CCT GCC CTG ACG CCC
1072   AGC AGC AAC CCC GCC GCC TCG GCA GGC CTG CAC TCC AGC ATG TCC TCC TAC
1123   TCG CTG GAG CAG AGC TAC TTG CAC CAG AAC GCT CGC GAG GAC CTC TCA G ←

```

Ende Exon 1

GTAACGCAGCACGCTCCAGCCCAGCCAGCTGGGCGCACCGCTTCTAGGCCTCCAGGGCTGGCG
GCCACTGCCACTCCCACAAACAGGGACCCCGAAGCTAGGAGGTCTGAGGGCAC[...]

CTGTCTAGCAATTTACTAAAAGGCACAGCAGCACCTTTTGTACTCTGAGGCAAAATAAGACACCCT
GCCATCCACTGGATGACTTTGTTTCTGAAGAGGTTTTTTTTCTTTCTTTCTTTCTAG → Beginn Exon 2










```

1172   TG GGA CTG CCC CGT TAC CAG CAT CAC TCT ACT CCA GTG TGT GAC AGA AAA
1222   GAT TTC GTC CTC AAC TTC AAT GGG ATT TCT TCT TTC CAT CCC TCA GCT AGC
1273   GGG TCG TAT TAT CAC CAT CAC CAC CAG AGC GTC TGT CAG GAT ATT AAG CCC
1324   TGC GTC ATG TGA ← Ende Exon 2

```

ACGGAAAGAGGCCAAGCGATGGCCCTCTCTCCTCTCCCCTCCTCAGAGGGGGCAGATAGAAA
CTGGGACGGATTCAAGTCACATGCACGCGGA[...]

Abb. 30 Darstellung der codierenden Sequenz des FOXF2-Gens mit Intron/Exon-Übergängen. Die Forkhead-Box in Exon 1 nach Blixt (1998) ist grau unterlegt, nach Hellqvist (1998) unterstrichen. Splice-Donor- und Akzeptorstellen wurden doppelt unterstrichen.

- | | | | |
|---|---------------------------|---|---------------------------|
|  | Mutation c.123C→T |  | Polymorphismus rs78728576 |
|  | SNP rs72667003 |  | Mutation c.344G→A |
|  | Polymorphismus rs34317327 |  | Mutation c.1177C→A |
|  | SNP c.1272C→T |  | SNP rs2293783 |
|  | Polymorphismus rs45600838 | | |

4.5 Familienbasierte Assoziationsanalyse

Bei der familienbasierten Assoziationsanalyse soll überprüft werden, ob (seltene) Allele überzufällig häufig gegenüber den Wildtypallelen von den Eltern auf ihre betroffenen Kinder vererbt werden bzw. ob ein Hinweis auf eine Assoziation zwischen dem untersuchten Marker und der Krankheit vorliegt. In der vorliegenden Studie stand zu zehn Spaltträgern zusätzlich Material beider Eltern zur Verfügung. In Abbildung 31 sind die Familien-Trios in Form eines Stammbaumes dargestellt. Des Weiteren sind die jeweiligen Genotypen jeder Person an den untersuchten Loci und die Spaltart des betroffenen Kindes angegeben.

Das Kind in Familie 74 (Abb. 31g) weist am Locus $TGF\alpha$ -D2S443 ein Merkmal auf, welches es nicht vom angegebenen Vater vererbt bekommen haben kann. Um zu untersuchen, ob es sich um eine Mutation oder einen Vaterschaftsausschluss handelt, wurde eine Analyse mittels *PowerPlex*[®] 16 System (Fa. Promega) durchgeführt. Hierbei lagen in 9 von 15 untersuchten Systemen Ausschlusskonstellationen vor, so dass praktisch erwiesen ist, dass es sich in diesem Fall nicht um den leiblichen Vater des betroffenen Kindes handelt. Daher wurde dieser nicht in die weitere Untersuchung einbezogen.

Vier der Eltern wiesen am Locus $TGF\alpha$ - Δ 4bp das seltene Allel auf. Dieses wurde in zwei von vier Fällen an das spalttragende Kind vererbt. 14 der 18 untersuchten Eltern waren an diesem Locus homozygot für das Wildtypallel und transmittierten dieses somit an ihr Kind. Die statistische Berechnung nach Bickeböllner (Bickeboller & Clerget-Darpoux, 1995) ergab mit einem p-Wert von 1 keinen Hinweis auf eine Assoziation dieses Allels zur Ausbildung einer LKGS. Weiterhin konnte kein besonders häufig vererbter Haplotyp für die beiden Polymorphismen des Gens $TGF\alpha$ ermittelt werden.

Nur einer der Elternteile (s. Abb. 31j) war heterozygot für den Polymorphismus $TGF\beta$ 3- Δ 6bp. Dieses Allel wurde jedoch nicht an das Kind vererbt. Auch die Mutter der Familie 74 trägt das seltene Allel, ohne es an ihr Kind transmittiert zu haben.

Alle untersuchten Probanden der aufgezeigten Trios waren homozygot für das Wildtypallel am SNP rs3917200, so dass in der Gesamtschau nicht von einer Assoziation der beiden $TGF\beta$ 3-Polymorphismen auf die Spaltbildung ausgegangen werden kann.

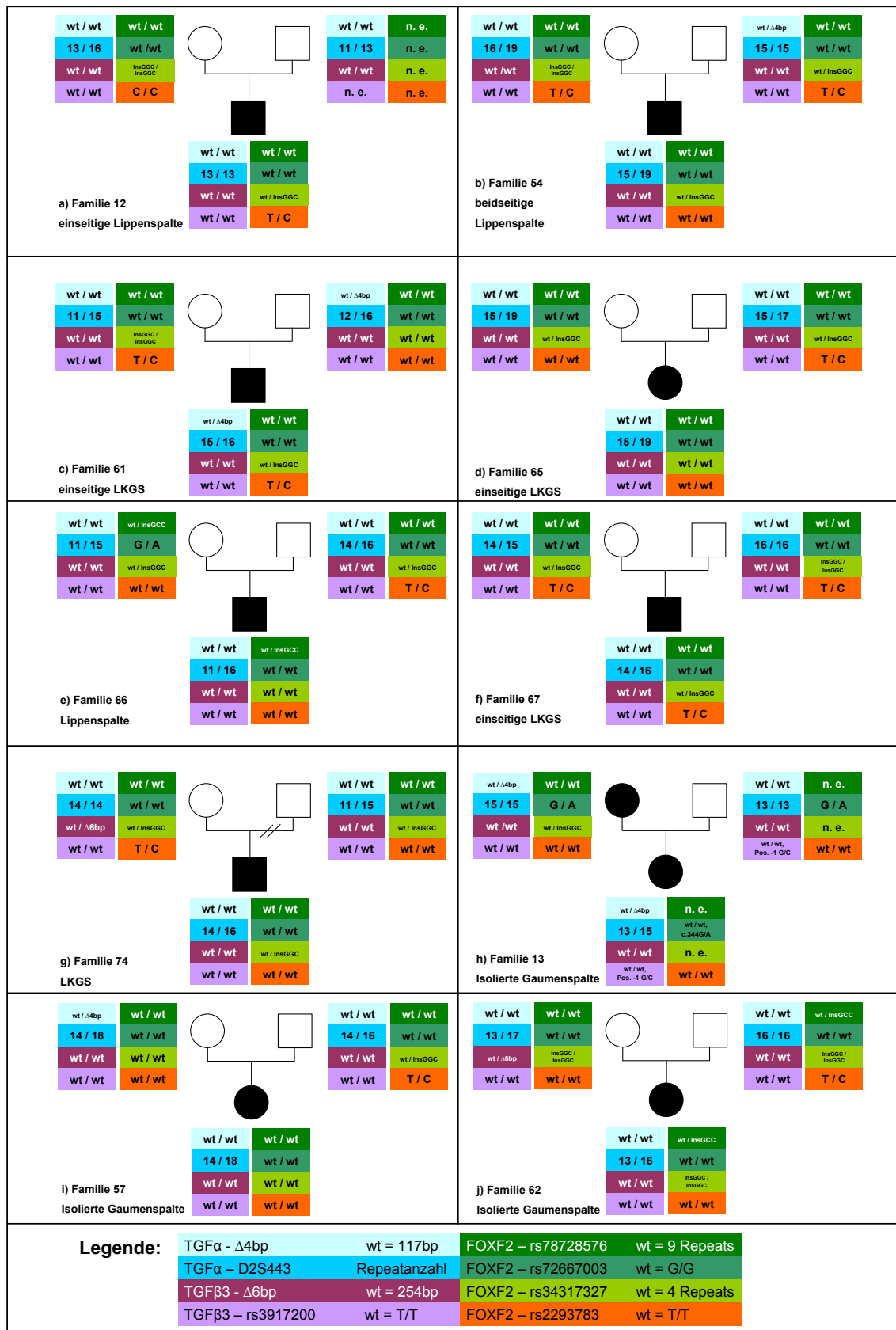


Abb. 31 Darstellung der Stammbäume der untersuchten Familien-Trios, sowie die ermittelten Genotypen an den untersuchten Loci der Gene TGFα, TGFβ3 und FOXF2. Sofern weitere, nicht in der Legende verzeichnete, Variationen auftraten, wurden diese mit Positionsangabe vermerkt. (n.e.= nicht ermittelt, O = ♀, □ = ♂, ■ | ● = betroffen)

Betrachtet man die Polymorphismen des FOXF2-Gens, wird ersichtlich, dass zwei der 17 typisierten Elternteile am Locus rs78728576 eine heterozygote Insertion des GCC-Triplets aufwiesen. Beide haben diese Insertion an ihre Kinder weitergegeben. An Position rs72667003 konnte bei drei der 18 Elternteile die heterozygote Form des Substitutionspolymorphismus gefunden werden; es wurde jedoch stets das Wildtypallel an die Kinder vererbt. Aufgrund der geringen Fallzahl wurde bei diesen beiden Polymorphismen auf eine statistische Analyse verzichtet.

Hinsichtlich des Längenpolymorphismus' rs34317327 konnten sieben vollständige Trios in die Untersuchung einbezogen werden. 7 von 14 Elternteile besaßen an diesem Locus eine heterozygote GGC-Insertion. Keiner dieser Probanden hat diese Insertion an sein betroffenes Kind transmittiert. Fünf der Eltern waren homozygot für das zusätzliche Triplet, weshalb sie dieses zwangsläufig an die Nachkommen vererbt haben. Homozygot für das Wildtypallel waren zwei der Eltern. Man geht im Normalfall von einer 50%igen Vererbungswahrscheinlichkeit für beide Allele aus. Im statistischen Test für die Weitergabe des Wildtypallels heterozygoter Eltern an ihre betroffenen Kinder zeigt sich ein p-Wert von 0,0078. Somit ist die Nullhypothese der zufälligen Gleichverteilung der Allele abzulehnen und eine überzufällig häufige Vererbung des Wildtypallels erwiesen. Mittels erweitertem TDT nach Bickeböller konnte für diesen Marker ein signifikanter p-Wert von 0,0067 ermittelt werden (mittels quasi-exaktem Test nach Hubig $p = 0,0076$). Der Wert zeigt an, dass für diesen Polymorphismus keine symmetrische Verteilung der Allele vorliegt. Dies gibt einen Hinweis auf eine mögliche Assoziation des Markers rs34317327 zur Ausbildung der LKGS und/oder dem Vorliegen einer Kopplung zwischen Marker und eigentlichem Krankheitslocus. Eine Assoziation zwischen der Insertion des GGC-Triplets und der Ausbildung einer Spalte konnte hingegen nicht erwiesen werden.

Die Punktvariante am Locus rs2293783 zeigten 10 der 18 analysierten Elternteile in heterozygoter Form. In zwei Fällen wurde das seltene Allel vererbt, in acht Fällen das Wildtypallel. Homozygot für das seltene Allel war ein Elternteil, homozygot für das Wildtypallel waren sieben Eltern. Das Wildtypallel wurde häufiger, mit einem p-Wert von 0,055 jedoch nicht statistisch signifikant überzufällig häufig, transmittiert. Die statistische Berechnung nach Bickeböller hingegen zeigte mit $p = 0,036$ eine Signifikanz (quasi-exakter Test nach Hubig $p = 0,0411$). Auch in diesem Fall ergibt sich ein Hinweis auf eine mögliche Assoziation des Markers rs2293783 zur

Ausbildung der LKGS, jedoch kein Hinweis auf eine Assoziation des seltenen Allels C.

Anhand der Genotypen der Eltern an den betreffenden Loci können in den meisten Fällen die Haplotypen der Kinder abgeleitet werden. So lässt sich ermitteln ob bzw. welche Polymorphismen gemeinsam auf einem Chromosom vererbt wurden. Tabelle 4.13 stellt die Haplotypen der Kinder für die vier häufigsten Polymorphismen im FOXF2-Gen dar. Aufgrund des doppelten Chromosomensatzes können für jedes Kind zwei Haplotypen (jeweils mütterlich bzw. väterlich ererbt) erstellt werden.

Tab. 4.13 Aus der Familienanalyse abgeleitete Haplotypen der untersuchten Kinder (zusammengesetzt aus den Varianten FOXF2 rs78728576, rs72667003, rs34317327, rs2293783)

| Fall-Nr. der Familie | Haplotyp des Kindes | |
|----------------------|---------------------|---------------------|
| | mütterlich ererbt | väterlich ererbt |
| 12 | wt/wt/InsGGC/C | wt/wt/wt/wt |
| 54 | wt/wt/InsGGC/wt | wt/wt/wt/wt |
| 61 | wt/wt/InsGGC/C | wt/wt/wt/wt |
| 65 | wt/wt/wt/wt | wt/wt/wt/wt |
| 66 | InsGCC/wt/wt/wt | wt/wt/wt/wt |
| 67 | wt/wt/wt/- | wt/wt/InsGGC/- |
| 57 | wt/wt/wt/wt | wt/wt/wt/wt |
| 62 | wt/wt/InsGGC/wt | InsGCC/wt/InsGGC/wt |

wt=Wildtypallel, Ins=Insertion, C=Substitution T→C

Anhand der Tabelle 4.13 lässt sich erkennen, dass wenn ein seltenes Allel bei den Kindern auftrat, dies häufiger von der Mutter ererbt wurde. In den Fällen, bei denen zwei Polymorphismen vorlagen (Familie 12, 61, 62), wurden diese auch gemeinsam auf einem Chromosom vererbt. Aufgrund der geringen Fallzahl erfolgte keine statistische Analyse.

5 Diskussion

Lippen-Kiefer-Gaumen(-Segel)-Spalten gehören zu den häufigsten angeborenen Anomalien des Menschen. Trotz jahrzehntelanger intensiver molekularbiologischer Forschung konnten bisher nur bedingt kausale Zusammenhänge zwischen genetischen Varianten und der Ausbildung von LKGS aufgedeckt werden. Genetische Ursachen für zahlreiche Syndrome, die mit einer Spaltbildung einhergehen, wurden gefunden. Für nicht-syndromale LKGS konnte hingegen bisher weder ein einzelnes Gen noch eine Kombination genetischer Veränderungen als Hauptursache festgestellt werden. Zweifellos besteht ein Zusammenhang zwischen Spaltbildung und Genetik, was Zwillingsstudien (Grosen et al., 2011) und die Tatsache populationsabhängiger Prävalenzschwankungen (IPDTC, 2011) bestätigen. Dass der Einfluss der genetischen Komponente zwar sehr hoch, jedoch nicht die alleinige Ursache sein kann, wird eindrucksvoll durch einen Drillingsfall in den USA veranschaulicht (präsentiert in Segal, 2009). Alle drei Kinder sind Träger einer Spalte, wobei diese in Art und Lokalisation von Kind zu Kind erheblich variiert. Daher geht man heute von einer multifaktoriellen Genese, unter Beteiligung polygener Risikofaktoren, im Zusammenhang mit exogenen Einflüssen aus.

In die vorliegende Studie wurden nur Patienten mit nicht-syndromaler LKGS einbezogen. Dabei wurde das Patientenkollektiv aufgrund der getrennten embryonalen Entwicklung von Kiefer und Gaumen in zwei Untergruppen geteilt; Träger einer Spalte, die ausschließlich den sekundären Gaumen betrifft (isolierte GS) und Träger von Spalten, die nur den primären bzw. primären und sekundären Gaumen betreffen (LK±GS).

5.1 Methodische Aspekte

5.1.1 Die Problematik der Amplifikation GC-reicher DNA-Sequenzen

Um in einer genetischen Analyse aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, ist eine hochspezifische Amplifikation der Zielsequenzen mittels PCR Voraussetzung. Für kurze DNA-Segmente sowie Fragmente mit einem GC-Gehalt von unter 60% kann häufig schon durch wenige Optimierungsmaßnahmen der PCR ein spezifisches Amplifikationsprodukt in ausreichender Menge erhalten werden. Bei Produktgrößen

von über 1000 bp, wie bei Exon 1 des FOXF2-Gens in der vorliegenden Arbeit, empfiehlt es sich, mehrere sich überlappende Teilfragmente zu amplifizieren. Dabei ist die Primerauswahl von entscheidender Bedeutung. Vor allem bei Sequenzen mit wiederkehrenden Motiven bzw. einer durch sehr hohen GC-Gehalt bedingten Gleichförmigkeit der Nukleotidfolge kann das Erstellen der richtigen Primersequenz erschwert werden. Daraufhin treten Probleme wie Zusatzbanden durch unspezifisches Primer-Annealing oder kompletter Ausfall der PCR auf. Insgesamt wurden für die gegenwärtige Studie über 40 verschiedene Primerkombinationen bei unterschiedlichsten PCR-Bedingungen getestet um das FOXF2-Gen vollständig zu amplifizieren und daraufhin zu sequenzieren. Das zweite Exon mit einer Länge von 164 bp und einem ausgewogenen Verhältnis der Nukleotide konnte in einem Stück problemlos vervielfältigt werden. Exon 1 hingegen musste in fünf Fragmente unterteilt werden, wobei jeweils umfangreiche PCR-Optimierungen nötig waren, um für jedes Teilfragment zufriedenstellende Amplifikationsraten zu erzielen. Besonders die Amplifikation des ersten Fragments (1-1) erwies sich aufgrund des extrem hohen GC-Anteils von 82% als problematisch. Es ist allgemein bekannt, dass Sekundärstrukturen wie Haarnadel- oder Loopstrukturen entstehen können, welche durch erhöhte Wasserstoffbrückenbindungen gefestigt werden. Diese erschweren die Denaturierung der DNA am Beginn der PCR, aber auch das Anlagern der Primer und die Bewegung der Polymerase entlang des zu amplifizierenden DNA-Stranges. Folgen waren der Ausfall der PCR oder durch unspezifisches Anlagern der Primer entstandene Zusatzprodukte falscher Sequenz. Diese wiederum führen in weiteren Analysen wie der Sequenzierung zu Überlagerungen der eigentlich erwünschten Sequenzen im Elektropherogramm und erschweren deren Auswertung. Ein Arrest der Polymerase während der PCR führt zu einem vorzeitigen Abbrechen der Amplifikation, was die vollständige Untersuchung einer Sequenz verhindert. Um die Amplifikation dieses GC-reichen DNA-Abschnittes zu gewährleisten wurden unterschiedliche Additive und Polymerasen getestet. Eine Übersicht über die angewandten Methoden, Additive und Enzyme sowie ihren Einfluss auf die Amplifikation des FOXF2-Fragments 1-1 und auf das TGFβ3-Fragment zur Untersuchung des Polymorphismus rs3917200 wurden in Strien et al. (2013) veröffentlicht.

Um den kompletten codierenden Bereich des FOXF2-Gens in optimaler Qualität vervielfältigen zu können, waren drei verschiedene Polymerasesysteme erforderlich.

Für das PCR-Produkt FOXF2 1-1 konnte eine spezifische Amplifikation nur mittels OneTaq® Hot Start DNA Polymerase (New England BioLabs) unter Verwendung des GC Reaction Buffers sowie eines speziellen, firmeneigenen High GC Enhancers erreicht werden. Für die Abschnitte 1-2, 1-3 und 1-3b war jeweils eine zufriedenstellende Amplifikation nur bei Einsatz des Multiplex PCR-Master Mix (Qiagen) anstelle eines Singleplex Puffersystems möglich. Fragment 1-3a wurde mit Hilfe der DAp GoldStar® DNA Polymerase (Eurogentec) vervielfältigt. Es war nötig der Reaktion DMSO (Dimethylsulfoxid) zuzugeben. Dies unterbindet die Ausbildung von Sekundärstrukturen, was die Schmelztemperatur der DNA verringert. Dadurch kann es vor allem bei GC-reichen Sequenzen zu einer Verbesserung der Amplifikationseffizienz führen (Hung et al., 1990).

5.1.2 Etablierung von effektiven PCR-Systemen mit minimaler DNA-Menge

Neben dem strukturellen Problem des hohen GC-Gehalts einiger DNA-Abschnitte ergab sich eine weitere Schwierigkeit bei der Etablierung der verschiedenen PCRs unserer Studie. Für jeden Probanden stand nur eine begrenzte Menge genetisches Material zur Verfügung, ohne die Möglichkeit für eine erneute Probenentnahme. Zum Teil konnten nur wenige Nanogramm DNA von den Mundschleimhautabrieben isoliert werden. Daher mussten sehr effiziente PCR-Bedingungen mit niedrigen Ausfallraten entwickelt werden.

Ältere Studien verwendeten für die Analyse der hier untersuchten Polymorphismen häufig Methoden wie RFLP-Untersuchungen und Southern Blot oder SSCP-Analysen. Dazu müssen große Mengen DNA in die Tests eingesetzt werden. Für die RFLP-Analyse wurden 5-10 µg DNA pro Reaktion benötigt (Ardinger et al., 1989; Shiang et al., 1993). Die SSCP-Analyse ermöglichte bereits erfolgreiche Genotypisierungen mit 2-4 ng DNA (Lidral et al., 1998).

In der hier dargestellten Studie gelang es für die Polymorphismen TGFα-Δ4bp, TGFα-D2S443 und TGFβ3-Δ6bp mit Hilfe des Multiplex PCR-Master Mix Kits (Qiagen) und fluoreszenzmarkierten Primern eine effektive Multiplex-Amplifikation aller drei PCR-Produkte in einer Reaktion zu erreichen. Unter minimalem Materialeinsatz von 0,5 ng DNA pro PCR-Reaktion konnte erfolgreich eine Fragmentlängenanalyse durchgeführt werden. Aufgrund präferentieller Amplifikation kurzer Fragmente kann es in Multiplex-Reaktionen zum so genannten *Allelic Dropout* kommen. Um sicherzustellen, dass lange Allele bzw. PCR-Fragmente richtig

typisiert werden, wurde für den Polymorphismus TGF α -D2S443 im Fall einer homozygoten Konstellation zusätzlich eine Singleplex-PCR durchgeführt.

Die Amplifikation der später zu sequenzierenden Fragmente erforderte jeweils mindestens 1-2 ng DNA pro Reaktion. Um einen Produktverlust, wie er bei herkömmlichen Aufreinigungsmethoden wie Ethanol-Fällung und Clean-Up über Säulen auftritt, zu vermeiden, wurde bei Proben mit besonders geringen PCR-Produktmengen die Aufreinigung über ExoSAP-IT[®] (Fa. Affymetrix) durchgeführt. Hierbei erfolgt das Clean-Up enzymatisch und ohne Probenübertragung, so dass final mit der höchstmöglichen Menge an PCR-Produkt zu rechnen ist.

5.2 Analyse der Polymorphismen im Kandidatengen TGF α

Dieses Kandidatengen wurde ausgewählt, da Tierversuche und Kopplungsstudien immer wieder Hinweise auf eine Assoziation der chromosomalen Region 2p zur Ausbildung von LKGS gaben (Ardinger et al., 1989; Carinci et al., 2000). Weiterhin konnte die Beteiligung des TGF α an einzelnen Schritten der Gaumenentwicklung mehrfach nachgewiesen werden (Dixon et al., 1991; Iamaroon et al., 1996). Nichtsdestotrotz bewirkt ein Knockout des Gens (im Mausexperiment) keine Spaltbildung (Luetkeke et al., 1993). Dies unterstützt die Theorie, dass TGF α eher eine Modifier-Funktion ausübt, als das tatsächlich ursächliche Gen für die Krankheitsentstehung zu sein.

In der Literatur werden mehrere Polymorphismen beschrieben, welche mit einer Spaltbildung assoziiert sein sollen, z.B. der Polymorphismus TGF α - Δ 4bp (Ardinger et al., 1989), die Mikrosatellitenregion D2S443 (Maestri et al., 1997), der SNP rs2902345 (Letra et al., 2012) und zahlreiche andere. Dem gegenüber stehen Studien, die keine Assoziation zu TGF α nachweisen konnten. Eine Übersicht über die bis zum Erscheinen der Literatur publizierten, inkonsistenten Ergebnisse findet man im Review von Vieira (2006). Vergleichend zu diesen internationalen Studien wurde in der vorliegenden Arbeit die Assoziation zweier ausgewählter Polymorphismen des TGF α -Gens an einem mitteldeutschen Patientengut untersucht.

5.2.1 Der Polymorphismus TGF α - Δ 4bp

Im Intron 5 des TGF α -Gens findet sich der Längenpolymorphismus TGF α - Δ 4bp. Diese 4bp lange Deletion wurde erstmals von Ardinger et al. (1989) mit der

Entstehung von LKGS in Verbindung gebracht. Dabei wurde mittels RFLP-Analyse an einem kaukasischen Patienten- und Kontrollkollektiv (Iowa, USA) das deletierte Allel, in der Literatur als „C2“ bezeichnet, signifikant häufiger bei den Patienten als bei den Kontrollen beobachtet ($p = 0,0047$). Diese Assoziation wurde für weitere kaukasische und chinesische Populationen bestätigt (Chenevix-Trench et al., 1991; Holder et al., 1992; Sassani et al., 1993; Zhang et al., 2004). Weitere Studien zeigten hingegen keine Assoziation in kaukasischen und anderen Populationen (vgl. Tab.5.1).

Die vorliegende Fall-Kontroll-Studie wurde an einem mitteldeutschen Untersuchungskollektiv durchgeführt, wobei die Probanden der kaukasischen Population zugeordnet werden können. Es wurde die Allelhäufigkeit und die Allelverteilung innerhalb der Kollektive bestimmt. Das seltene Allel $\Delta 4\text{bp}$ konnte in der Patientengruppe mit $\text{LK}\pm\text{GS}$ mit einer Frequenz von 0,07 und mit isolierter GS von 0,09 nachgewiesen werden. Dies entspricht in etwa der Frequenz (0,1) die auch für das Kontrollkollektiv ermittelt werden konnte.

Eine Übersicht über einige ausgewählte Literaturwerte zur Häufigkeit des Allels in verschiedenen Populationen ist der Tabelle 5.1 zu entnehmen. In der afrikanisch stämmigen US-Population ist die Frequenz des seltenen Allels am höchsten (Patienten: 0,381; Kontrollen: 0,188), während sie in der britischen und brasilianischen Population am niedrigsten ist (0,04/0,05) (Holder et al., 1992; Passos-Bueno et al., 2004; Sassani et al., 1993). Es zeigt sich also durchaus ein populationsabhängiger Unterschied im Vorkommen des Allels. Somit wird erneut die Wichtigkeit der homogenen Auswahl der Kontrollprobanden deutlich.

Es lassen sich erhebliche Abweichungen unserer mitteldeutschen Ergebnisse zu den ältesten Daten von Ardinger et al. (1989) und Chevenix-Trench et al. (1991) erkennen. In den kaukasisch stämmigen US-Kontrollkollektiven konnte nur etwa halb so häufig das seltene Allel nachgewiesen werden wie in der hier untersuchten deutschen Population. Dem gegenüber steht eine deutlich höhere Frequenz des $\Delta 4\text{bp}$ -Allels in den Patientengruppen der amerikanischen bzw. australischen Kollektive. Eine große Differenz zu den in unserem Labor ermittelten Frequenzen ergab sich, trotz kaukasoidem Ursprung beider Gruppen, auch im Vergleich zum britischen Untersuchungsgut von Holder et al. (1992). Diese wiesen das seltene Allel im Patientenkollektiv dreimal so häufig nach wie in der mitteldeutschen Gruppe wohingegen es im Kontrollkollektiv weniger als halb so oft auftrat.

Tab. 5.1 Übersicht ausgewählter Studien zur Assoziation des Polymorphismus TGF α - Δ 4bp in unterschiedlichen Populationen (sowohl Fall-Kontroll- als auch familienbasierte Analysen)

| Studie | Population | Kollektivgröße | | Allelfrequenz Patienten / Kontrollen | | Assoziation des seltenen Allels |
|-----------------------------|-----------------------------|----------------|------------|--------------------------------------|-------------------------|---|
| | | Patienten | Kontrollen | WT | Δ 4bp | |
| Ardinger et al. 1989 | kaukasisch (Iowa/USA) | 78 | 98 | 0,865 / 0,95 | 0,135 / 0,05 | ja |
| Chevenix-Trench et al. 1991 | kaukasisch (Australien) | 96 | 100 | 0,823 / 0,945 | 0,172 / 0,055 | ja |
| Hecht et al. 1991 | kaukasisch (USA) | | | | | nein |
| Holder et al. 1992 | britische Population | 55 | 60 | 0,79 / 0,96 | 0,21 / 0,04 | ja |
| Sassani et al. 1993 | kaukasisch (USA) | 83 | 84 | 0,819 / 0,911 | 0,169 / 0,089 | ja |
| | asiatisch | 6 | 6 | 0,833 / 0,833 | 0,167 / 0,167 | |
| | schwarz | 11 | 8 | 0,636 / 0,688 | 0,318 / 0,188 | |
| Shiang et al. 1993 | kaukasisch (Iowa/USA) | | | | | ja (zu isolierter GS) |
| Jara et al. 1995 | kaukasoid-mongoloid (Chile) | 39 | 51 | 0,923 / 0,922 | 0,077 / 0,078 | nein |
| Lidral et al. 1997 | Philippinen | 749 | 776 | | | nein |
| Lidral et al. 1998 | kaukasisch (Iowa/USA) | | | 0,9/0,902 | 0,1 / 0,098 | nein |
| Christensen et al. 1999 | Dänemark | 316 | 604 | 0,872/0,864 | 0,128 / 0,136 | nein (in Kombination mit während der Schwangerschaft rauchenden Müttern) |
| Jugessur et al. 2003 | Norwegen | 262 | | | | ja (nur für homozygot Δ 4bp) |
| Zhang et al. 2004 | China | 107 | 136 | | | ja |
| Passos-Bueno et al. 2004 | Brasilien | 536 | 412 | \emptyset 0,95 / 0,95 | \emptyset 0,05 / 0,05 | nein |
| Rahman et al. 2008 | Malaysia | 46 | 33 | | | nein |
| Souza et al. 2012 | Brasilien | 175 | | | | nein (Kombination mit Tabak- und/oder Alkoholkonsum) |
| vorliegende Studie | kaukasisch (Deutschland) | 75 | 105 | 0,93/0,9 | 0,07/0,1 | nein |

Anhand ihrer Daten konnten Holder et al. somit auch eine Assoziation des seltenen Allels zur Spaltbildung berechnen. In unserer Studie konnte diese Assoziation nicht bestätigt werden. Für die Gesamtkollektive, unabhängig von Spaltart und Geschlecht, ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Allelverteilung zwischen Patienten- und Kontrollgruppe ($p = 0,43$).

Betrachtet man die Subpopulation der Träger einer LK \pm GS im dargestellten Patientengut, so lässt sich weder für die gesamte Gruppe noch nach geschlechtlicher Trennung eine statistisch signifikante Differenz der Allelhäufigkeit und -verteilung erkennen. Shiang et al. (1993) konnten eine Assoziation des seltenen Allels zur Ausbildung von isolierten Gaumenspalten nachweisen. Auch diese Annahme wird durch unsere eigenen Ergebnisse nicht unterstützt. Das seltene Allel wurde im GS-Kollektiv nahezu gleich häufig ermittelt wie in der Kontrollgruppe ($p = 0,85$).

Jugessur et al. (2003) stellten die signifikante Assoziation zur Spaltbildung nur bei Personen mit einem homozygot deletierten Genotyp (Δ 4bp/ Δ 4bp) fest. Weiterhin stellte Holder et al. (1992) eine Verbindung zwischen der homozygoten Variante und dem Auftreten von beidseitigen Spalten her. Diese Beobachtungen wurden in unserem Kollektiv nicht gemacht. Der homozygot deletierte Genotyp trat nur bei zwei Probanden auf. Bei diesen handelte es sich um gesunde Kontrollpersonen. Daraus

folgt, dass kein additiver Effekt des seltenen Allels nachgewiesen werden konnte und dieser Genotyp nicht als Risikofaktor bestätigt wurde.

Auch die statistische Auswertung der zehn Familien-Trios der hier vorgestellten Studie weist nicht auf eine gehäufte Vererbung des seltenen Allels hin ($p = 1$). Nur vier der Eltern wiesen das $\Delta 4\text{bp}$ -Allel auf. Zwei Mal wurde es an die betroffenen Kinder transmittiert, zwei Mal wurde das Wildtypallel vererbt. In Anbetracht der zu geringen Anzahl untersuchter Personen kann keine statistisch signifikante Aussage getätigt werden.

In der vorliegenden Studie, wie auch in zahlreichen anderen Arbeiten, wurden insgesamt weniger als 100 Patienten untersucht (vgl. Tab. 5.1). Daher sind die Ergebnisse kritisch zu betrachten. Eine Assoziation des seltenen Allels zur Spaltbildung wurde besonders in Untersuchungen an kleinen Kollektiven festgestellt, während die Studien mit sehr großem Untersuchungsgut meist keine Verbindung zwischen $\text{TGF}\alpha$ - $\Delta 4\text{bp}$ und Erkrankung nachweisen konnten. Dies und die eigenen Ergebnisse geben Anlass zur Annahme, dass kein direkter Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus $\text{TGF}\alpha$ - $\Delta 4\text{bp}$ und der Ausbildung von LKGS besteht.

5.2.2 Der Polymorphismus $\text{TGF}\alpha$ -D2S443

Gegenstand der Untersuchung war die Mikrosatellitenregion D2S443, welche nahe dem $\text{TGF}\alpha$ -Gen in der nicht-codierenden Region lokalisiert ist. Es sind 12 Allele bekannt, die in der vorliegenden Studie nach ihrer Repeat-Anzahl der repetitiven AAGG-Tetranukleotide benannt wurden. Die erste Untersuchung zum Zusammenhang dieses Locus' mit der Ausbildung einer Spalte wurde an einem US-amerikanischen und mexikanischen Familienkollektiv durchgeführt (Wyszynski et al., 1997). Dabei konnte keine signifikante Assoziation der einzelnen Allele bzw. keine Kopplung des Polymorphismus' zu einem Suszeptilitätslocus in den beiden Populationen festgestellt werden. Anhand eines TDT konnten Maestri et al. (1997) hingegen eine vermehrte Transmission des Allels 4 in ihrem US-amerikanischen Kollektiv beobachten. Diese konnte jedoch nicht als statistisch signifikant erwiesen werden. Weitere Studien konnten in kaukasischen Kollektiven (Iowa + Maryland/USA) weder durch eine Fall-Kontroll-Analyse noch durch eine familienbasierte Untersuchung eine Assoziation des D2S443 zu Ausbildung von LKGS nachweisen (Beaty et al., 2001; Lidral et al., 1998). Eine Studie ermittelte mit

Hilfe des ETDT jedoch einen signifikanten Wert für die seltene Weitergabe des Allels *239bp* in chilenischen Familien-Trios (Suazo et al., 2005).

Die Allele werden in der Literatur unterschiedlich benannt. Dies erschwert die Vergleichbarkeit der Ergebnisse. So tritt in der vorliegenden Studie kein Allel 239 auf. Die nahe liegenden Fragmente besitzen eine Größe von 236bp (Allel 15) und 240bp (Allel 16). Dies kann auf einer leicht unterschiedlichen Primersequenz während der PCR beruhen. Auch das von Maestri et al. beschriebene Allel 4 kann nicht eindeutig zugeordnet werden, da in der Publikation keine Fragmentlänge angegeben wurde.

In der hier dargestellten Studie wurde zuerst die Häufigkeit der einzelnen Allele in den Patienten- und Kontrollkollektiven bestimmt. Das gesamte Untersuchungsgut betrachtet finden sich alle 12 möglichen Allele in der mitteldeutschen Population. Zusätzlich wurde ein dreizehntes, bisher nicht beschriebenes Allel ermittelt, welches eine Punktvariante darstellt. Zwei Patienten wiesen eine Insertion eines Basenpaares auf, woraus ein 18.1 Allel resultierte. Da der Mikrosatellit D2S443 im nicht-codierenden Bereich des Chromosoms 2 lokalisiert ist, folgt aus der Insertion keine Veränderung der Aminosäuresequenz eines Proteins. Seit einiger Zeit ist jedoch bekannt, dass die nicht-codierende DNA keineswegs komplett funktionslos ist. Wichtige regulatorische Elemente wie Promotoren und Enhancer finden sich in diesem Bereich. So konnte das Forschungsprojekt ENCODE 2012 erfolgreich ihre viel diskutierten und kritisierten Ergebnisse von 2007 bestätigen, welche besagen, dass ca. 80% der menschlichen DNA eine Funktion erfüllen und darin ca. 2,9 Millionen regulatorische Elemente zu finden sind (ENCODE et al., 2012).

Somit ist, auch wenn bisher keine Literatur dazu erschienen ist, nicht auszuschließen, dass der Bereich um den Marker D2S443 einem regulatorischen Element angehört. Die hier gefundene Mutation mit dem neu entstandenen Allel 18.1, die bei zwei Patienten, jedoch bei keiner der 103 Kontrollen gefunden wurde, könnte somit durchaus einen Einfluss auf Genexpression und die embryonale Entwicklung haben.

Hinsichtlich der Häufigkeit der 12 bereits bekannten Allele zeigte sich im mitteldeutschen Kollektiv keine signifikante Differenz zwischen Patienten- und Kontrollgruppe ($p = 0,44$). In beiden Gruppen kamen die Allele 14, 15 und 16 am häufigsten vor (Tab. 4.3 & 4.4). In der Studie von Lidral et al. (1998) wurde gleichfalls eine Häufung von drei Allelen mittlerer Länge beschrieben (Allel 5-7). Da wiederum keine Fragmentlänge angegeben wurde und insgesamt nur 11 der 12 Allele beobachtet

wurden, kann nicht eindeutig ermittelt werden, ob es sich um die gleichen Allele handelt. In der Gruppe der LK±GS-Träger findet sich das Allel 13 weniger als halb so oft wie in der Kontrollgruppe, während das Allel 16 deutlich häufiger unter den Patienten auftritt. Diese Differenzen der Verteilung sind jedoch nicht statistisch signifikant ($p = 0,26$). Die Verteilung der Allele im Kollektiv der Patienten mit isolierter Gaumenspalte unterscheidet sich ebenfalls nicht signifikant von der Verteilung innerhalb des Kontrollkollektivs ($p = 0,62$). Die Assoziation des Allels 239 bei Souza et al. (2005) wurde durch eine familienbasierte Untersuchung ermittelt. In der vorliegenden Studie wurde die Vererbung der Allele gleichfalls anhand von zehn Trios analysiert. Dabei ließ sich keine überzufällig häufige oder seltene Transmission eines bestimmten Allels nachweisen. Es ist jedoch zu bedenken, dass ein Untersuchungsgut von zehn Familien ein zu kleines Kollektiv darstellt, um statistisch haltbare Aussagen treffen zu können.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich die Häufigkeiten und Verteilungsmuster der einzelnen Allele zwischen Patienten und Kontrollen nicht signifikant unterscheiden, weder in der Gesamtschau der Kollektive noch nach getrennter Betrachtung der verschiedenen Spaltarten und Geschlechter. Es ergibt sich kein Hinweis auf eine Assoziation dieses Locus mit der Ausbildung von LKGS. Somit bestätigen sich die Ergebnisse von Lidral et al. (1998) und Beaty et al. (2001).

5.3 Analyse der Polymorphismen im Kandidatengen TGFβ3

Aufgrund der besonderen Rolle des auf Chromosom 14 lokalisierten TGFβ3-Gens während der Embryonalentwicklung wurde es als weiteres Kandidatengen für die Ursachenforschung nicht-syndromaler LKGS ausgewählt. Tierversuche zeigten die vielfältige Funktion dieses Gens bzw. des entstandenen Proteins auch während der Gaumenentwicklung (Fitzpatrick et al., 1990; Gato et al., 2002; Pelton et al., 1990). Dies wird ebenso durch das Ausbleiben der Verschmelzung der Gaumenplatten bei TGFβ3-Knock-out Mäusen deutlich (Kaartinen et al., 1995).

Eine Meta-Analyse von 13 Genom-Scans lies eine Kopplung zwischen TGFβ3-Locus und LKGS erkennen (Marazita et al., 2004). Anhand unterschiedlicher Populationen konnte bereits, zum Teil spaltart- bzw. geschlechtsabhängig, eine Assoziation zwischen Polymorphismen im TGFβ3-Gen bzw. dessen Umgebung und der Entstehung von LKGS nachgewiesen werden (Ichikawa et al., 2006; Jugessur et al., 2003; Kim et al., 2003; Lidral et al., 1998; Maestri et al., 1997).

5.3.1 Der Polymorphismus TGF β 3- Δ 6bp

Der Polymorphismus TGF β 3- Δ 6bp befindet sich in der 5'-UTR des TGF β 3-Gens, genauer im Promotorbereich des Gens. Die 6 bp lange Deletion eines „AGAGGG“-Motivs wurde erstmals von Lidral et al. (1998) mit der Ausbildung von LKGS in Verbindung gebracht. In einer Fall-Kontroll-Studie an der bereits bei der Analyse des TGF α -Gens erwähnten kaukasischen Population (Iowa/USA) konnte zwar keine Assoziation des Polymorphismus zur Spaltbildung nachgewiesen werden, sehr wohl jedoch eine Kopplungstendenz des Markers zur Entstehung von LK \pm GS in der Familienanalyse. Es gab keine Hinweise für einen Zusammenhang mit isolierten Gaumenspalten. Dem entgegen stellten Vieira et al. (2003) eine signifikante Assoziation nur bei isolierten GS in einem südamerikanischen Kollektiv fest.

In der vorliegenden Studie sollte ein möglicher Einfluss des seltenen Allels Δ 6bp zum Auftreten von LKGS in der deutschen Population untersucht werden. Dazu wurde zunächst die Allelfrequenz des deletierten Allels bestimmt. In der Studie von Lidral et al. (1998) konnte eine Frequenz von 0,06 für die kaukasische Population Iowas ermittelt werden. Die Häufigkeit in unserer deutschen Kontrollgruppe beträgt 0,09 und liegt somit etwas höher als in der US-Population. Die Frequenz im deutschen Patientengut mit LK \pm GS und auch mit isolierter Gaumenspalte beträgt jeweils 0,03, also deutlich weniger als in dem Kontrollkollektiv. Gleichfalls liegt diese Häufigkeit unter den für die amerikanischen Patienten ermittelten Werten (für LK \pm GS 0,04, für GS 0,07). Eine Assoziation zwischen dem seltenen Allel Δ 6bp und der Ausbildung einer LKGS konnte in der vorliegenden Studie nicht nachgewiesen werden. Unabhängig von Spaltart und Geschlecht ließ sich eine ähnliche Allelverteilung zwischen Patienten- und Kontrollkollektiv erkennen. Der heterozygote Genotyp mit einem deletierten Allel trat in der Kontrollgruppe mit 16% sogar mehr als doppelt so häufig auf wie in der Patientengruppe (7%). Eine Kontrollperson wies den homozygot deletierten Genotyp auf; unter den Patienten fand sich dieser nicht. Auch innerhalb der nach Spaltart getrennten Kollektive unterschied sich die Allelverteilung im Vergleich zu den Kontrollen nicht signifikant (LK \pm GS $p = 0,17$, GS $p = 0,49$). Somit konnten die Ergebnisse der Fall-Kontroll-Studie von Lidral et al. bestätigt werden. Die von Vieira et al. festgestellte Assoziation zur Bildung von isolierten Gaumenspalten konnte hingegen nicht verifiziert werden. Dies ist möglicherweise auf die unterschiedlichen Testverfahren zurückzuführen. Bei der Untersuchung der zehn Familientrios der vorliegenden Arbeit wiesen insgesamt nur zwei der Elternteile das

seltene Allel $\Delta 6\text{bp}$ auf (in heterozygoter Form). In beiden Fällen wurde jedoch das Wildtypallel an das betroffene Kind transmittiert. Somit ergibt sich auch hier kein Hinweis auf eine Verbindung des deletierten Allels zu einem erhöhten Spalttrisiko. Aufgrund der geringen Familien-Fallzahl kann dieses Ergebnis jedoch nicht als signifikant gewertet werden.

5.3.2 Der Polymorphismus TGF β 3-rs3917200 (-38T \rightarrow C)

Die Punktvariante rs3917200 findet sich im Intron 4 des TGF β 3-Gens. Sie ist durch die Substitution eines T-Nukleotids gegen ein C-Nukleotid charakterisiert und an Position -38 relativ zur Intron/Exon-Grenze lokalisiert. In der Literatur wird die Position dieses SNPs auch mit -24 zur Intron/Exon-Grenze angegeben, was möglicherweise auf verschiedene Referenzsequenzen und Übertragungsfehler zurückzuführen ist (Lidral et al., 1998; Reutter et al., 2008).

Wiederum war es die Arbeitsgruppe um Lidral, die erstmalig eine Assoziation dieses Polymorphismus zu LKGS untersuchte (1998). Anhand einer Fall-Kontroll-Studie am bereits erwähnten kaukasischen Kollektiv (Iowa/USA) wurde keine Assoziation zur Spaltbildung festgestellt. In einer familienbasierten Untersuchung mittels TDT konnten sie jedoch eine Kopplung des Markers und dem Auftreten von LK \pm GS nachweisen. Dies war für isolierte Gaumenspalten nicht möglich. Mitchell et al. (2001) konnten an ihrem dänischen Untersuchungsgut keine Assoziation dieser Sequenzvariante zu einer der Spaltarten feststellen.

Für die vorliegende Studie wurde zunächst die Häufigkeit des seltenen C-Allels bestimmt. Die Frequenz beträgt im Kontrollkollektiv 0,06. Dies entspricht dem Wert für die kaukasische Population in Iowa (Lidral et al., 1998). Im Patientenkollektiv kam das seltene Allel mit einer Häufigkeit von 0,03 weniger oft vor. Eine Übersicht der in der Literatur ermittelten Frequenzen bzw. Genotypen ist der Tabelle 5.2 zu entnehmen. Ähnliche Werte lassen sich auch dem Reference SNP Cluster Report (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=3917200) für diesen Polymorphismus entnehmen, welcher Populationsdaten unabhängig von etwaigen Krankheiten darstellt. Hier wird für europäische Untersuchungsgruppen von Frequenzhäufigkeiten des C-Allels von 0,04 bis 0,167 berichtet.

Keine der untersuchten Personen unserer Studie wies die Substitution in homozygoter Art auf. Im Kontrollkollektiv wie auch im Patientenkollektiv trat der homozygote Wildtyp am häufigsten auf (87% bzw. 93%). Daraus folgt, dass im

deutschen Kollektiv der Wildtyp unter den Patienten etwas verbreiteter ist als bei den Kollektiven aus den USA und Dänemark (vgl. Tab. 5.2). Die Verteilung der Genotypen unterscheidet sich in der vorliegenden Arbeit nicht signifikant zwischen der gesamten Patienten- und Kontrollgruppe ($p = 0,31$).

Tab. 5.2 Literaturübersicht zur Assoziation des Polymorphismus TGF β 3-rs3917200 in unterschiedlichen Populationen

| Studie | Population | Genotyp-Anteil Patienten/Kontrollen | | Allelfrequenz Patienten / Kontrollen | | Assoziation des seltenen C-Allels |
|----------------------|--------------------------|--|--------------|---|-----------|---------------------------------------|
| | | T/T | T/C oder C/C | WT | C-Allel | |
| Lidral et al. 1998 | kaukasisch (Iowa/USA) | | | 0,95/0,94 | 0,05/0,06 | Fall-Kontroll-Studie: nein TDT: ja |
| Romitti et al. 1999 | kaukasisch (Iowa/USA) | 90%/87% | 10%/13% | | | nein |
| Mitchell et al. 2001 | kaukasisch (Dänemark) | 85%/85,8% | 15%/14,2% | | | nein |
| vorliegende Studie | kaukasisch (Deutschland) | 93,2%/87,4% | 6,8%/12,6% | 0,97/0,94 | 0,03/0,06 | nein |

Nur vier der LK \pm GS Patienten und einer der Patienten mit isolierter Gaumenspalte wiesen den heterozygoten Genotyp auf. Nach statistischer Analyse für beide Gruppen besteht keine Assoziation zwischen dem seltenen C-Allel und einer der beiden Spaltarten. Gleiches gilt für die getrennte Untersuchung männlicher und weiblicher Probanden. Somit bestätigen sich die Ergebnisse der aufgezeigten Studien.

Auch hinsichtlich der untersuchten Familien-Trios kann eine Assoziation des C-Allels in unserem Kollektiv ausgeschlossen werden, da alle untersuchten Eltern und somit auch die betroffenen Kinder den Wildtyp T/T aufwiesen.

5.4 Kombinierte Betrachtung der Polymorphismen im Bereich TGF α und TGF β 3

Man geht heute von einer multifaktoriellen und polygenen Ursache für die Entstehung von LKGS aus. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit auch die sich aus den jeweils zwei Polymorphismen für TGF α und TGF β 3 zusammensetzenden Genotypen und die Kombination der Allele an diesen Loci betrachtet.

Hinsichtlich der beiden Polymorphismen im Bereich des TGF α -Gens fand sich keine überzufällig häufige Allelkombination bei den Patienten. Es traten ähnliche Verteilungsmuster im Patienten- wie Kontrollkollektiv auf. Auffällig war jedoch, dass beide Patienten, die die Punktvariante 18.1 im Polymorphismus D2S443 aufwiesen,

auch das seltene Allel $TGF\alpha$ - $\Delta 4bp$ tragen. Da einer der Patienten Träger einer isolierten Gaumenspalte und der andere Träger einer einseitigen LKGS ist, kann kein Hinweis auf einen Zusammenhang mit einer bestimmten Spaltart abgeleitet werden. Aufgrund der Tatsache, dass das Allel 18.1 bisher noch in keiner der früheren Studien aufgetreten ist, ist anzunehmen, dass es sich bei dieser Kombination zumindest nicht um einen häufigen Prädispositionsfaktor handelt. Es wäre nötig größere Kollektive hinsichtlich dieser Allelkombination zu untersuchen, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten.

Betrachtet man die Kombination der Genotypen im Bereich des $TGF\beta 3$ -Gens, fällt auf, dass keiner der Patienten an beiden Loci das seltene Allel aufweist. Lediglich eine Kontrollperson zeigt diese Konstellation in heterozygoter Form. Es ist somit in unserer mitteldeutschen Population nicht von einer Assoziation der Kombination der beiden seltenen Allele $\Delta 6bp$ und Allel C zur Spaltbildung auszugehen. Lidral et al. (1998) konnten in der Familienanalyse des kaukasischen Kollektivs (Iowa/USA) hingegen eine signifikante Assoziation der Kombination dieser beiden Marker zur Ausbildung von $LK\pm GS$ ermitteln. Dies galt jedoch nicht für isolierte Gaumenspalten, wie es durch die Tierversuche mit $TGF\beta 3$ -Knockout-Mäusen eher zu erwarten gewesen wäre (Proetzel et al., 1995).

Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit gezielt nach gehäuften Genotypkombinationen beider Gene gesucht. Bei nur einer Patientin konnten beide Deletionspolymorphismen nachgewiesen werden. Da jedoch auch drei Kontrollpersonen diese Kombination zeigten, spricht dies gegen eine Assoziation der Kombination der Sequenzvarianten $TGF\alpha$ - $\Delta 4bp$ und $TGF\beta 3$ - $\Delta 6bp$ mit dem Entstehen von LKGS.

Dass kein Patient die Kombination aus seltenem $\Delta 4bp$ -Allel im $TGF\alpha$ und Allel C im Polymorphismus rs3917200 aufwies, jedoch vier Personen des Kontrollkollektivs, spricht gleichermaßen gegen die Assoziationstheorie der Allelkombination aus $TGF\alpha$ und $TGF\beta 3$. Daher sollten andere Gene auf eine mögliche Gen-Gen Interaktion in Bezug auf die Spaltbildung analysiert werden. Für beide hier beschriebene Gene konnte so bereits an Spaltkollektiven eine statistische Assoziation zum Gen MSX1 nachgewiesen werden (Jugessur et al., 2003; Vieira et al., 2003). Funktionelle Studien zu diesem Thema lassen sich der Literatur jedoch nicht entnehmen.

5.5 Mutationsanalyse des Kandidatengens FOXF2

FOX-Proteine sind wichtige Transkriptionsfaktoren während der Embryonalentwicklung. Die Entwicklung von Geweben aus allen drei Keimblättern wird durch die verschiedenen FOX-Familienmitglieder beeinflusst.

Bereits 1987 wurde erstmals eine Kopplung zwischen dem distalen Ende des Chromosoms 6 und der Entstehung von LKGS an einem dänischen Patientenkollektiv postuliert (Eiberg et al., 1987). Auch eine spätere Meta-Analyse von 13 Genom-Scans bestätigte eine Kopplung zur Region 6p23-p25 (Marazita et al., 2004). Bisherige Studien konzentrierten sich eher auf die Regionen 6p23 und 6p24 (Davies et al., 1995; Scapoli et al., 2010), während sich die vorliegende Arbeit mit der Analyse des auf dem Chromosom 6p25.3 lokalisierten FOXF2-Gens beschäftigt.

Tierversuche zeigten eine starke Expression des Foxf2 im kraniofazialen Bereich (Aitola et al., 2000; Ormestad et al., 2004; Wang et al., 2003). Zusätzlich impliziert die Tatsache, dass Foxf2-Knockout-Mäuse, ähnlich den TGFβ3-Knockout-Mäusen, generell eine Spalte des sekundären Gaumens aufweisen, eine Funktion als Entwicklungsregulator während der Palatogenese (Wang et al., 2003).

Aufgrund dieser Hinweise auf eine Beteiligung des FOXF2-Gens an der Genese des Gaumens wurde in der vorliegenden Studie die vollständige codierende Sequenz sowie die Exon/Intron-Übergänge hinsichtlich Variationen und Mutationen in einem deutschen Spaltkollektiv analysiert. Bisher liegen keine Vergleichsdaten aus der Literatur zu diesem Thema vor. Jochumsen et al. (2008) konnten an 18 Patienten bereits einige Abweichungen zur Referenzsequenz aufzeigen. Diese Patienten wiesen jedoch neben einer Spaltbildung auch Störungen der Geschlechtsentwicklung auf. Somit stellt die vorliegende Arbeit die erste Assoziationsstudie zu FOXF2 bei isolierten, nicht-syndromassozierten LKGS dar.

Insgesamt konnten neun Sequenzabweichungen innerhalb des FOXF2-Bereiches ermittelt werden. In den meisten Fällen handelt es sich um Polymorphismen, was definitionsgemäß einer Auftretensfrequenz von über 1% in der Population entspricht. Dabei konnten zwei Längenpolymorphismen und drei recht häufige Einzelnukleotidpolymorphismen sowie vier seltene SNPs nachgewiesen werden. In Abbildung 32 sind die Positionen der Sequenzvariationen des Exon 1 in Relation zu bekannten funktionellen Domänen dargestellt.



| | |
|--|--|
| 1 | ATG ACC ACC GAG GGC GGG CCG CCG CCG GCC CCG CTC CGC CGC GCG TGC AGC |
| 52 | CCG GTC CCC GGC GCG CTC CAG↓GCC GCC CTG ATG AGC CCG CCG CCC GCC GCC |
| 103 | GCC GCC GCC GCC GCC GCC GC CCG GAG ACC ACC TCC TCC TCC TCG TCG TCG |
| 154 | TCC TCC GCC TCC TGC GCC TCG TCC TCG TCC TCC TCC AAT TCG GCC AGC GCC |
| 205 | CCC TCG GCT GCC TGC AAG AGC GCG GGC GGC GGC GGC GCG GGC GCC GGG AGC |
| 256 | GGG GGC GCC AAG AAG GCG AGC TCG GGG CTG CGG CGG CCC GAG AAG CCG CCC |
| 307 | TAC TCG TAC ATC GCG CTC ATC GTC ATG GCC ATC CAG A C TCG CCC AGC AAG |
| 358 | CGC CTG ACG CTC AGC GAG ATC TAC CAG TTC CTG CAG GCG CGC TTC CCC TTC |
| 409 | TTC CGC GGC GCC TAC CAG GGC TGG AAG AAC TCG GTG CGC CAC AAT CTC TCG |
| 460 | CTC AAC GAG TGC TTC ATC AAG CTG CCT AAG GGC CTC GGG CGG CCC GGC AAG |
| 511 | GGC CAC TAC TGG ACC ATC GAC CCG GCC AGC GAG TTC ATG TTC CAG GAG GGC |
| 562 | TCG TTC CGC CGC CGG CCG CGC GGC TTC AGG CGG AAG TGC CAG GCG CTC AAG |
| 613 | CCC ATG TAC CAC CGC GTG GTG AGC GGC TTG GGC TTC GGG GCG TCG CTG CTG |
| 664 | CCC CAG GGC TTC GAC TTC CAG GCG CCC CCG TCG GCG CCG CTC GGC TGC CAC |
| 715 | AGC CAG GGC GGC TAC GGC GGC CTC GAC ATG ATG CCC GCG GGC TAC GAC GCC |
| 766 | GGC GCG GGC GCC CCC AGC CAC GCG CAC CCT CAC CAC CAC CAC CAC CAC CAC |
| 817 | GTC CCG CAC ATG TCG CCC AAC CCG GGT TCC ACC TAC ATG GCC AGC TGC CCG↓ |
| 868 | GTG CCC GCG GGA CCC GGG GGC GTC GGT GCG GCC GGG GGC GGC GGC GGC GGC |
| 919 | GAC TAC GGG CCG GAC AGC AGC AGC AGC CCG GTA CCC TCG TCC CCG GCC ATG |
| [...] | |
| <p>Legende: <u>unterstrichen</u> = Forkhead Box (\triangle AS 64-166)</p> <p> <i>kursiv</i> = Teil der Box, die nicht als NLS agiert (\triangle AS 115-152)</p> <p> <u>Grau unterlegt</u> = TBP-Bindungsstelle</p> <p> <u>Doppelt unterstrichen</u> = Erster Teil der AD2</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>Mutation c.123C→T SNP rs72667003 ↓ Polymorphismus rs34317327</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>↓ Polymorphismus rs78728576 Mutation c.344G→A</p> </div> </div> | |

Abb. 32 Auszug aus der codierenden Sequenz des Exon 1 des FOXF2-Gens. Gekennzeichnet sind die Positionen der in der vorliegenden Arbeit ermittelten Polymorphismen/Mutationen in Relation zu funktionellen Domänen nach Hellqvist et al. (1998). (NLS = Kernlokalisierungsdomäne, TBP = TATA-Bindeprotein, AD = Aktivierungsdomäne). Der Übersichtlichkeit halber wurde auf die Markierung der Lokalisation der Forkhead-Box nach Blixt et al. (1998) verzichtet. Diese findet sich an Position c.283 - c.600 (Aminosäuren 95 bis 201).

5.5.1 Die Längenpolymorphismen c.97GCC[9]+[10] und c.904GGC[5]+[6]

(rs78728576 & rs34317327)

Der Polymorphismus c.97GCC[9]+[10] ist durch eine Insertion eines GCC-Tripletts an Position c.97 des ersten Exons im FOXF2-Gen charakterisiert. Die Referenzsequenz weist an dieser Position neun GCC-Wiederholungen auf, welche auf Proteinebene einen Alaninstretch hervorrufen. Dieser wird durch die Insertion um ein weiteres Alanin verlängert, der Leserahmen wird jedoch nicht verschoben. Der beschriebene Locus befindet sich in der Sequenz vor dem wichtigen Bereich der Forkhead Box in einer funktionell bisher nicht charakterisierten Region (vgl. Abb. 32).

Zuerst wurde die Frequenz der Insertion innerhalb der Patienten- und Kontrollkollektive ermittelt. Dabei traten mit 0,06 in der Patientengruppe und 0,04 in der Kontrollgruppe ähnliche Häufigkeiten auf, weshalb auch die statistische Analyse keine signifikante Differenz zwischen den Kollektiven erbrachte ($p = 0,7$). Nur eine Trägerin einer isolierten Gaumenspalte und drei Patienten mit LK±GS wiesen diese Expansion auf. Bei keiner der untersuchten Personen konnte die Variante in homozygoter Form festgestellt werden. Diese Ergebnisse geben auch nach statistischer Auswertung (LK±GS $p = 0,67$, GS $p = 0,47$) keinen Hinweis auf eine direkte Assoziation dieses Polymorphismus zur Ausbildung von LKGS. Auch Jochumsen et al. (2008) beobachteten diesen Polymorphismus bei einem der Patienten in heterozygoter Form, jedoch bei keiner der 20 Kontrollen. Diese Diskrepanz zu unseren Ergebnissen erklärt sich möglicherweise durch das recht kleine Untersuchungskollektiv Jochumsens von insgesamt 38 Probanden.

Bei der Untersuchung der Familientrios unserer Studie fiel auf, dass nur zwei der 17 genotypisierten Elternteile die heterozygote Insertion GCC aufwiesen. In beiden Fällen wurde das verlängerte Allel an die Kinder transmittiert. Die geringe Anzahl heterozygoter Personen erlaubt keine statistische Analyse bzw. Aussage über eine mögliche Assoziation zur Spaltbildung.

Der zweite nachgewiesene Längenpolymorphismus c.904GGC[5]+[6] findet sich auch im ersten Exon des untersuchten Gens; mit Position 904 jedoch hinter den funktionell wichtigen Bereichen der Forkhead Box und der Aktivierungsdomäne (vgl. Abb. 32). In der Referenzsequenz finden sich an dieser Stelle fünf GGC-Repeats, welche auf Proteinebene in einem Glycinstretch resultieren. Den GGC-Tripletts vorgelagert ist ein GGG-Codon, welches gleichermaßen Glycin verschlüsselt, so dass im Normalfall ein Stretch aus sechs Glycinen entsteht. Sofern der Polymorphismus auftritt, expandiert diese Repeatsequenz auf sechs GGC-Tripletts bzw. sieben Glycinreste. Auch hierbei folgt keine Leserahmenverschiebung.

Diese Insertion tritt wesentlich häufiger auf als die zuvor beschriebene Expansion an Position 97. Mit einer Allelfrequenz von 0,46 bei den Patienten und 0,45 bei den Kontrollen kommt das verlängerte Allel in der deutschen Population vergleichbar oft vor wie das Wildtypallel. Außerdem findet sich zwischen Kontrollen und Patienten keine signifikante Differenz in der Allelverteilung ($p = 0,33$), auch nicht nach getrennter Betrachtung der verschiedenen Spaltarten.

Die kompletten Patienten- und Kontrollgruppen betrachtet, ist zu erkennen, dass der homozygote Genotyp mit Insertion in beiden Allelen häufiger bei den Patienten (25,7%) als bei den Kontrollen (19,6%) auftritt. In der Studie von Jochumsen et al. bestätigt sich diese Beobachtung. Hier wird die Diskrepanz zwischen dem Auftreten der homozygoten Insertion bei den Patienten mit 27,7% und bei den Kontrollen mit 10% sogar noch deutlicher. Diese Werte sind jedoch nicht signifikant. Somit ergibt sich auch hier kein eindeutiger Hinweis auf eine funktionell relevante Variation bzw. auf eine direkte Assoziation des Polymorphismus zur Spaltbildung. Die Familienanalyse zeigte, dass 50% der einbezogenen Elternteile die GGC-Insertion in heterozygoter Weise besaßen. Davon hat keiner das insertionstragende Allel vererbt. Der statistische Test für die Weitergabe des Wildtypallels heterozygoter Eltern an ihre spalttragenden Kinder ergab einen p-Wert von 0,0078. Dieser Wert zeigt eine überzufällig häufige Transmission des Wildtypallels an. Auch mittels erweitertem TDT wurde ein signifikanter Wert berechnet ($p = 0,0067$). Es liegt also keine symmetrische Allelverteilung vor, was möglicherweise auf eine Assoziation des Markers zur Spaltbildung bzw. Kopplung zwischen Marker und Krankheitslocus hinweisen kann. Eine Assoziation zwischen GGC-Insertion selbst und der Entstehung einer LKGS konnte hingegen nicht nachgewiesen werden.

Das Allel c.97GCC[10] und der homozygote Genotyp c.904GGC[6] waren im Patientenkollektiv etwas häufiger zu beobachten als bei den Kontrollen. Die untersuchte Probandenanzahl ist jedoch zu gering um definitive Aussagen treffen zu können. Es ist allerdings bekannt, dass Expansionen von Längenpolymorphismen Krankheiten hervorrufen können, sogar wenn sie lediglich in untranslatierten Regionen auftreten. Die Länge dieser Repeats wird nicht immer stabil von den Eltern an ihre Kinder vererbt, so dass variable Wiederholungsanzahlen die phänotypischen Varianzen bedingen können. Je länger eine solche Expansion wird, desto eher und schwerwiegender tritt die Krankheit auf (Orr & Zoghbi, 2007). Ein eindrucksvolles Beispiel einer solchen Trinukleotiderkrankung stellt Chorea Huntington dar. Bei gesunden Personen sind im Huntingtin-Gen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 4 vier bis 35 CAG-Wiederholungen nachweisbar. Im Krankheitsfall finden sich 36 bis 121 dieser Tripletts, wobei ab einer Anzahl von 60 Wiederholungseinheiten die juvenile Krankheitsform auftritt (Andrew et al., 1993). Eine weitere Trinukleotiderkrankung, die jedoch zu einem Expressions- bzw. Funktionsverlust des

Proteins führt, ist das Fragiles-X-Syndrom. Hierbei führt die Verlängerung eines CGG-Stretches im FMR1-Gen, genauer im nicht-codierenden Bereich der 5'-UTR, zu einer fehlerhaften Methylierung der dortigen CpG-Insel und einer mangelhaften Acetylierung der Histone am 5'-Ende des Gens (Orr & Zoghbi, 2007). Eine wesentlich seltenere Variante dieses Syndroms ist das Fragiles-XE-Syndrom, welches auf einer Expansion eines GCC-Repeats in der 5'-UTR des FMR2-Gens beruht. Diese resultiert wiederum in einer Hypermethylierung einer CpG-Insel (Gecz et al., 1996). Ein GCC-Triplett codiert, wie bereits bei dem in der vorliegenden Studie nachgewiesenen Polymorphismus c.97GCC[9]+[10] beschrieben, für die Aminosäure Alanin. Das Fragiles-XE-Syndrom resultiert jedoch erst aus einer Wiederholungsanzahl von über 200. Das heißt, bei einer Insertion eines Triplets, wie beim hier gezeigten Polymorphismus, sind noch keine Krankheitserscheinungen erkennbar. Weitere Polyalaninerkrankungen treten jedoch bereits bei geringeren Repeatanzahlen auf (Winter et al., 2013). Darunter finden sich auch zwei Erkrankungen, die auf Veränderungen von Genen der FOX-Familie beruhen. Das BPES (Blepharophimose-Syndrom) zeichnet sich durch Anomalien des Auges und zum Teil auch Ovarialinsuffizienz aus. Es wird durch eine Ausdehnung der normalerweise 14 Alaninreste im Transkriptionsfaktor FOXL2 auf 24 hervorgerufen (Crisponi et al., 2001). Auffällig ist, dass auch diese Mutation nicht innerhalb der wichtigen Forkhead-Box liegt, sondern C-terminal davon, gleich dem hier vorgestellten Polymorphismus c.904GGC[5]+[6]. Daraus lässt sich schließen, dass durchaus Veränderungen genetischer Bereiche außerhalb der funktionellen Domänen entscheidende Auswirkungen auf die Genexpression bzw. Funktion haben können.

Carre et al. (2007) konnten weiterhin zeigen, dass ein Polymorphismus im codierenden Bereich des FOXE1-Gens als genetischer Anfälligkeitsmarker für angeborene Fehlentwicklungen der Schilddrüse genutzt werden kann. Dieser Polyalanin-Locus kann sechs verschiedene Allele aufweisen, wobei jedoch zwei Allele deutlich häufiger in der Population auftreten (bei >95% der Probanden) als die anderen vier. Durch eine Assoziationsstudie konnten sie nachweisen, dass das Allel 16 signifikant seltener bei Patienten (mit thyreoidalen Anomalien) als bei Kontrollen auftritt und somit eine Art „Schutz“ vor der Ausbildung solcher Fehlbildungen zu sein scheint. Funktionelle Studien zeigten zudem, dass das FOXE1-Gen mit Allel 16 im Vergleich zu kürzeren Allelen eine deutlich stärkere Expression der Zielgene zur Folge hat. Zwar konnte in der vorliegenden Arbeit kein signifikant häufigeres

Vorkommen eines der Allele des Polymorphismus' c.97GCC[9]+[10] im Patientenkollektiv nachgewiesen werden, es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass aus den verschiedenen langen Allelen unterschiedliche Aktivierungsfähigkeiten des FOXF2-Gens resultieren.

Ähnliches gilt für den zweiten hier aufgeführten Längenpolymorphismus c.904GGC[5]+[6]. Bisher liegen keine funktionellen Analysen zur möglichen Auswirkung dieser Veränderung vor. Hinsichtlich anderer Erkrankungen konnten jedoch bereits Polyglycin-Bereiche als Anfälligkeitsloci bestätigt werden. So wiesen z.B. Radpour et al. (2007) eine Assoziation zwischen einem Polyglycin-Polymorphismus' im Androgen-Rezeptorgen und Hypospadie, einer angeborenen Fehlbildung der Harnröhre, nach. Weiterhin konnte eine Risikoerhöhung für Brustkrebs mit einem GGC-Polymorphismus im GSPT1-Gen in Verbindung gebracht werden (Miri et al., 2012). Eines der vier möglichen Allele (12-GGC) erhöht das Risiko der Brustkrebsentwicklung 3-fach, während auch die homozygote Variante eines weiteren Allels (7-GGC) das Risiko steigert. In diesem Fall führt das längere Allel 12-GGC zu einer Steigerung der Expression der durch GSPT1 codierten mRNA des Proteins (eRF3a) selbst (Malta-Vacas et al., 2009).

5.5.2 Die Einzelnukleotidpolymorphismen c.262G→A, c.1284T→C und *25G→A

(rs72667003, rs2293783, rs45600838)

Anhand unseres mitteldeutschen Untersuchungsguts konnten drei SNPs als Polymorphismen bestätigt werden, da ihre Frequenz auch bei den gesunden Kontrollen weit über 1% lag. Der erste dieser Polymorphismen kommt durch eine Transitionsmutation zustande. In diesem Falle heißt das, es wurde die Purinbase Guanin durch die Purinbase Adenin an Position c.262 des ersten Exons ersetzt. Auf Proteinebene verursacht diese missense Mutation einen Austausch der Aminosäure Alanin gegen Threonin. Diese beiden Aminosäuren weisen unterschiedliche elektrische Ladungen auf. Alanin ist unpolar und hydrophob, während Threonin eine polare Aminosäure darstellt, die an Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt ist. Somit resultiert aus dieser Substitution eine Ladungsänderung des Proteins, die eine Konformationsänderung zur Folge haben könnte. Funktionelle Auswirkungen solcher Veränderungen sind jedoch stark von ihrer Position im Protein abhängig. In Abbildung 30 ist zu erkennen, dass der Polymorphismus im FOXF2-Gen vor der Forkhead-Box liegt, sofern man die Angaben von Blixt et al. (1998) betrachtet. Die Lokalisierung der Box nach Hellqvist et al. (1998) ließe den Schluss zu, dass der

SNP innerhalb des Forkhead-Bereiches und auch innerhalb der Kernlokalisierungsdomäne liegt (vgl. Abb. 32).

Nur bei zwei der untersuchten Patienten konnte dieser Polymorphismus nachgewiesen werden, was einer Allelfrequenz des A-Allels von 0,014 entspricht. Unter den Kontrollen war er hingegen mit einer Frequenz von 0,06 deutlich häufiger zu finden. Die statistische Analyse der Allelverteilung zeigte jedoch keine signifikante Häufung des Allels bei den Kontrollen. Auch in der familienbasierten Analyse zeigte sich, dass drei der 18 Elternteile diesen Polymorphismus aufwiesen. Es wurde jedoch stets das Wildtypallel an die Kinder vererbt. Bei Jochumsen et al. (2008) wurde dieser SNP sowohl bei Patienten als auch bei Kontrollen gefunden. Aufgrund des seltenen Auftretens unter den Patienten im Vergleich zu den gesunden Probanden unserer Studie ist eine funktionelle Relevanz des Polymorphismus eher auszuschließen. Wiederum ist zu bedenken, dass Polymorphismen auch positive Effekte und Selektionsvorteile bieten können und daher in diesen Fällen eher bei Kontrollpersonen auftreten. Ein Beispiel hierfür ist der Polymorphismus rs63750847. Hierbei handelt es sich um eine Mutation im APP-Gen (Amyloid- β Precursor Protein) welche gleichermaßen eine Substitution von Alanin zu Threonin bewirkt (A673T). Dieser Polymorphismus tritt signifikant häufiger ($p = 4,78 \times 10^{-7}$) bei älteren, nicht von Alzheimer betroffenen, Personen auf als bei Alzheimer-Patienten. Aufgrund dessen wird diesem Polymorphismus eine protektive Wirkung zugeschrieben (Jonsson et al., 2012). Um Ähnliches für die in der vorliegenden Studie ermittelten Polymorphismen nachweisen zu können, müssten bedeutend größere Kollektive untersucht werden.

Der Polymorphismus c.1284T→C findet sich im zweiten Exon des FOXF2-Gens. Auch hierbei handelt es sich um eine Transition, wobei ein Thymin-Nukleotid durch ein Cytosin getauscht wird. Sowohl unter den Patienten als auch unter den Kontrollen konnten Träger dieser Mutation ermittelt werden. Meist trat die Variante in heterozygoter Form auf, selten auch homozygot, wobei die Homozygotie mehr als doppelt so häufig bei Patienten zu finden ist als bei Kontrollen. Auffällig war, dass die Einzelfrequenz des seltenen C-Allels in der Gruppe der Patienten mit isolierter Gaumenspalte (0,09) deutlich unter der Frequenz bei LK±GS-Trägern (0,22) und Gesunden (0,21) lag. Die Verteilung der Allele unterschied sich jedoch statistisch nicht signifikant zwischen Spaltträgern und Kontrollen. Die Daten von Jochumsen et al. (2008) stellen sich im Vergleich etwas anders dar. In ihrer Studie wiesen 39% der Patienten die heterozygote Substitution auf, dem gegenüber nur 5% der Kontrollen. Die homozygote Form trug einer der Patienten, aber keine der Kontrollpersonen.

Dieser Basenaustausch bewirkt auf Proteinebene keine Veränderung der Aminosäuresequenz, es handelt sich somit um eine synonyme („stumme“) Mutation. Es ist seit einigen Jahren bekannt, dass auch diese Mutationen und Polymorphismen Auswirkungen auf das fertige Protein haben können. Vor allem das Spleißen der RNA und die spätere Proteinfaltung können beeinflusst werden (Pagani et al., 2005). Bisher sind über 50 Krankheiten bekannt, die (zumindest teilweise) durch synonyme Mutationen ausgelöst werden können. So wurde beispielsweise gezeigt, dass stille Mutationen im APC-Gen (Adenomatöses Polyposis Coli Gen) während des Spleißens zum Überspringen ganzer Exons führt und daraufhin in familiärer adenomatöser Polyposis resultiert (Aretz et al., 2004). Dem gleichen Mechanismus folgt auch eine der möglichen Mutationen, denen die Entstehung der Phenylketonurie zugrunde liegt. Die Adenin zu Thymin Substitution an Position c.1197 des PAH-Gens (Phenylalanin-Hydroxylase) bewirkt einen Ausschluss des Exon 11 aus der mRNA. Somit entsteht ein fehlerhaftes PAH-Enzym und der Phänotyp der Phenylketonurie (Chao et al., 2001). Weiterhin konnte eine Assoziation von zwei stummen Polymorphismen im Gen für den Dopamin-Rezeptor D1 mit dem Auftreten von Schizophrenie nachgewiesen werden (Grymek et al., 2009). Die Arbeitsgruppe geht davon aus, dass sich diese Polymorphismen auf die Sekundärstruktur der mRNA auswirken, was zu einer verminderten Translation führt und zudem die Proteinstruktur des Rezeptors beeinflusst. Auch in Verbindung mit der Entstehung von LKGS wurde eine Assoziation einer stillen Mutation bereits nachgewiesen. Dabei verändert die Mutation C471T im CRISPLD2-Gen ein Splicing Enhancer Motiv und bringt eine neue Bindestelle für Transkriptionsfaktoren hervor (Letra et al., 2011).

Der Polymorphismus c.1284T→C der vorliegenden Studie konnte bisher keiner spleiß-relevanten Region zugeordnet werden, befindet sich allerdings innerhalb der Aktivierungsdomäne 1 (AD1) des FOXF2-Proteins (vgl. Abb. 35). Es ist nicht auszuschließen, dass dies auch hier eine gewisse Veränderung der Sekundärstruktur hervorrufen kann. Da er jedoch vergleichbar häufig unter Betroffenen und Kontrollen aufgewiesen wurde, spricht nichts für eine Assoziation bzw. eine ausschlaggebende Rolle bei der Entstehung von LKGS. Auch die familienbasierte Untersuchung ergab keinen Hinweis auf eine Assoziation des seltenen Allel C zur Spaltbildung. Zehn der 18 Elternteile wiesen an diesem Locus den heterozygoten Genotyp auf. Das seltene Allel wurde jedoch nur in zwei Fällen transmittiert. Auch das Wildtypallel wurde nicht statistisch signifikant häufiger vererbt ($p = 0,055$). Nur der TDT nach Bickeböller ergab eine leichte statistische Signifikanz

($p = 0,036$), was auf eine Assoziation des Markers zur Krankheit hindeuten kann. Hierbei ist jedoch wieder die geringe Fallzahl zu bedenken und eine Untersuchung eines deutlich größeren Familienkollektivs anzustreben.

Der Polymorphismus *25G→A (rs45600838) befindet sich in der nicht-codierenden 3'-untranslatierten Region des FOXF2-Gens. Die 3'-UTR enthält häufig regulatorische Elemente, die die Genexpression beeinflussen. So können Mutationen in der Polyadenylierungssequenz oder Bereichen, die Einfluss auf die Sekundärstruktur der mRNA und die Bindung anderer Proteine haben, Krankheiten verursachen. Bennett et al. (2001) identifizierten eine seltene A→G Transition im ersten Polyadenylierungssignal nach dem Stop-Codon des FOXP3-Gens bei einem Patienten mit IPEX (Immundysregulation, Polyendokrinopathie und Enteropathie, X-chromosomales Syndrom). Der Patient wies ansonsten keine der acht bekannten Varianten des FOXP3-Gens auf, welche IPEX auslösen können. Weiterhin wurde diese Mutation bei keiner der 212 Kontrollen nachgewiesen. Bennett et al. vermuten als Entstehungsmechanismus der Krankheit eine unspezifische Degradation des FOXP3-Proteins.

Dem gegenüber konnten Chen et al. (2006) an 83 Varianten im 3'-UTR-Bereich verschiedener Gene zeigen, dass diese Auswirkungen auf die Sekundärstruktur der mRNA haben können und somit funktionelle Sequenzen darstellen. Eine Veränderung dieser Struktur kann die Effizienz der Translation beeinflussen und bis zur völligen Störung der Expression führen (Barrett et al., 2012). Eine Studie von Abrahams et al. (2013) konnte eine solche Strukturänderung als kausal zur Ausbildung einer Achillessehnen Tendinopathie bestätigen. Dabei verursachen verschiedene Polymorphismen der 3'-UTR Modifikationen der RNA-Struktur, was deren Stabilität beeinflusst. Die Sequenzänderung der mRNA kann auch Effekte auf die Bindung weiterer Proteine und regulierender miRNAs haben. So beobachtete die Arbeitsgruppe um Zhang et al. (2011) eine gesteigerte Bindungsaffinität der miR-367 zur Wildtypsequenz des RYR3-Gens (bzw. dessen mRNA), im Gegensatz zur mutierten Variante mit einer A→G Transition in der 3'-UTR. Eine verminderte miR-367-Bindung förderte wiederum die Proliferation und Migration der untersuchten Zellen. Die Studie umfasste ebenfalls eine Fall-Kontroll-Analyse, welche zeigte, dass diese A→G Substitution als Risikofaktor für Brustkrebs angesehen werden kann.

Für den in der vorliegenden Arbeit beobachteten Polymorphismus *25G→A ist in der Literatur bisher keine funktionelle Relevanz des betreffenden Sequenzabschnittes

beschrieben. Er trat in unserem Kollektiv insgesamt bei 2,7% der Patienten und 4,8% der Kontrollen auf, daher ist nicht von einer direkten Bedeutung für die Genese von LKGS auszugehen.

5.5.3 Seltene Varianten im FOXF2 Gen (c.123C→T, c.344G→A, c.1177C→A, c.1272C→T)

Vier der in der vorliegenden Studie ermittelten Mutationen traten nur bei jeweils einem bzw. zwei Probanden des Gesamtkollektives auf. Bei der ersten dieser seltenen Varianten handelt es sich um eine Punktmutation an Position c.123 des ersten Exons des FOXF2-Gens. Diese C→T Transition bewirkt auf Proteinebene keine Veränderung der Aminosäuresequenz. Aufgrund der Degeneriertheit des genetischen Codes verschlüsselt sowohl das GCC-Triplett des Wildtypallels als auch das neu entstandene GCT-Triplett die Aminosäure Alanin. Da diese Veränderung eine stumme Mutation darstellt und ausschließlich bei einer gesunden Kontrollperson nachzuweisen war, ist nicht von einem Krankheitswert auszugehen.

An Position c.344 fand sich bei einer Patientin (P13-3) mit isolierter Gaumenspalte eine weitere Transition. Diese konnte bei keiner der Kontrollen ermittelt werden. Auch im Kollektiv von Jochumsen et al. (2008) wurde diese Mutation nicht nachgewiesen. Hierbei handelt es sich um einen Basenaustausch von Guanin zu Adenin. Die daraus resultierende Veränderung des Basentriplets bewirkt auf Proteinebene einen Austausch der Aminosäure Serin zu Asparagin. Beide zählen zu den polaren, neutralen Aminosäuren. Die Mutation findet sich zentral im Sequenzbereich der Forkhead Box (vgl. Abb. 32), das heißt der Region, welche später im Protein für die DNA-Bindung maßgeblich ist. Eine weitere Funktion der Box besteht in der Kernlokalisierung des Proteins, wobei nicht die gesamte Forkhead Box-Sequenz diese Aufgabe erfüllt. Die Position c.344 liegt in dem Bereich, welcher nicht als Kernlokalisierungsdomäne agiert. Somit bewirkt die Substitution keine Störung des Kerntransports. Auffällig ist, dass diese Aminosäure zwischen verschiedenen homologen FOXF2-Genen konserviert ist. Ein Alignment der Aminosäuresequenzen verschiedenster Tierarten hat gezeigt, dass dieser Bereich der Forkhead-Box einschließlich des betreffenden Serin-Restes zwischen den Arten identisch ist (Abb. 33). Dies lässt eine funktionelle Relevanz vermuten.

| | | |
|--|-----|----------------------------|
| Mensch (human) | 101 | PPYSYIALIVMAIQSSPSKRLTLSEI |
| Maus (Mus musculus) | 101 | PPYSYIALIVMAIQSSPSKRLTLSEI |
| Schimpanse (Pan troglodytes) | 98 | PPYSYIALIVMAIQSSPSKRLTLSEI |
| Krallenfrosch (Xenopus (Silurana) tropicalis) | 63 | PPYSYIALIVMAIQSSPTKRLTLSEI |
| Weißbüschelaffe (Callithrix jacchus) | 72 | PPYSYIALIVMAIQSSPSKRLTLSEI |
| Breitmaulnashorn (Ceratotherium simum simum) | 73 | PPYSYIALIVMAIQSSPSKRLTLSEI |
| Gürteltier (Dasypus novemcinctus) | 215 | PPYSYIALIVMAIQSSPSKRLTLSEI |
| Hauskatze (Felis catus) | 201 | PPYSYIALIVMAIQSSPSKRLTLSEI |
| Amerikanischer Pfeifhase (Ochotona princeps) | 148 | PPYSYIALIVMAIQSSPSKRLTLSEI |
| Walross (Odobenus rosmarus) | 107 | PPYSYIALIVMAIQSSPSKRLTLSEI |
| Tasmanischer Teufel (Sarcophilus harrisii) | 117 | PPYSYIALIVMAIQSSPSKRLTLSEI |

Abb. 33 Alignment der Aminosäuresequenz eines Teilbereiches der Forkhead Box des FOXF2-Proteins. Zwischen den verschiedenen Tierarten besteht 100%ige Übereinstimmung. Rot markiert ist der konservierte Serinrest, welcher bei Patientin P13-3 mutiert ist. (Quelle der Aminosäuresequenzen: NCBI Datenbank, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=foxf2\[gene\]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=foxf2[gene]))

Weiterhin wurde ein Alignment der Sequenzen der Forkhead Box anhand verschiedener Mitglieder der FOX-Proteinfamilie durchgeführt um eine Konservierung des mutierten Serin-Restes zu prüfen. Dabei fiel auf, dass nicht alle FOX-Proteine an dieser Stelle einen Serin-Rest aufwiesen, sondern durchaus eine Variabilität zwischen den Unterklassen auftritt. Innerhalb der Klasse der FOXF- und FOXO-Proteine sowie die Klassen FOXM und FOXS, die nur ein angehöriges Protein besitzen, scheint jedoch durchaus eine Konservierung vorzuliegen (Abb. 34).

| | | | | | |
|-------|-----|-----------------------------|-------|-----|------------------------------|
| FOXF2 | 101 | PPYSYIALIVMAIQSSPSKRLTLSEI | FOXJ2 | 67 | PRYSYATLITYAINSSPAKKMTLSEI |
| FOXF1 | 49 | PPYSYIALIVMAIQSSPTKRLTLSEI | FOXJ3 | 79 | PPYSYASLITFAINSPPKKKMTLSEI |
| FOXA1 | 171 | PPYSYISLITMAIQAPSKMLTLSEI | FOXK1 | 306 | PPFSYAQLIVQAISQAQDRQLTLSEI |
| FOXA2 | 166 | PPYSYISLITMAIQSPNKMLTLSEI | FOXK2 | 259 | PPYSYAQLIVQAITMAPDKQLTLNGI |
| FOXA3 | 118 | PPYSYISLITMAIQAPGKMLTLSEI | FOXL1 | 50 | PPYSYIALIAMAQDAPEQRTVLNGI |
| FOXB1 | 14 | PPYSYISLTAMAIQSSPEKMLPLSEI | FOXL2 | 55 | PPYSYVALIAMAIRESAEKRLTLSEI |
| FOXB2 | 14 | PPYSYISLTAMAIQSAEKMPLPLSDI | FOXM1 | 236 | PPYSYAMAIQFAINS TERKRM TLKDI |
| FOXC1 | 79 | PPYSYIALITMAIQNAPDKKITLNGI | FOXN1 | 272 | PIYSYSLIFMALKNSKTGSLPVSEI |
| FOXC2 | 73 | PPYSYIALITMAIQNAPEKKITLNGI | FOXN2 | 113 | PPYSFSLIYMAIEHSPNKCLPVKEI |
| FOXO1 | 126 | PPYSYIALITMAILQSPKKRLTLSEI | FOXN3 | 115 | PPYSFSLIFMAIEDSPTRKRLPVKDI |
| FOXO2 | 128 | PPYSYIALITMAILQSPKKRLTLSEI | FOXN4 | 194 | PIYSYSLIAMALKNSKTGSLPVSEI |
| FOXO3 | 142 | PPYSYIALITMAILQSPQKRLTLSEI | FOXO1 | 161 | GNLSYADLITKAIESAEKRLTLSEI |
| FOXO4 | 105 | PPSSYIALITMAILQSPHKRLTLSEI | FOXO3 | 158 | GNLSYADLITRAIESSPDKRLTLSEI |
| FOXO5 | 108 | PPYSYIALITMAILQSPHKRLTLSEI | FOXO4 | 102 | GNQSYAELISQAIESAPEKRLTLSEI |
| FOXO6 | 109 | PPYSYIALITMAILQNPCHKRLTLSEI | FOXO6 | 170 | GNLSYADLITKAIESAPDKRLTLSEI |
| FOXO1 | 54 | PPYSYIALIAMAIAHAPERRLTLGGI | FOXP1 | 465 | PPFTYASLRQAILESPEKQLTLNEI |
| FOXO2 | 54 | PPYSYIALIAMAIAHAPERRLTLGGI | FOXP2 | 505 | PTTPTAPVTPITQGPSVITPASVNV |
| FOXO3 | 72 | PPYSYIALIAMAIAHAPERRLTLGGI | FOXP3 | 338 | PPFTYATLRWAILEAPEKQRTLNEI |
| FOXG1 | 182 | PPFSYNALIMMAIRQSPKRLTLNGI | FOXP4 | 468 | PPFTYASLRQAILETPDRQLTLNEI |
| FOXH1 | 34 | PPYTYLAMIALVIAAPSRRLKLAQI | FOXQ1 | 120 | PPYSYIALIAMAIRDASAGRLTLAEI |
| FOXI1 | 124 | PPYSYALIAMAIHAPDKRLTLSEI | FOXR1 | 174 | PPLNYFHIALALRNSPPCGLNVQEI |
| FOXI2 | 103 | PPYSYALIAMAIQSAPLRKLTLSEI | FOXR2 | 193 | PPLNCSHIALALRNNPHCGLSVQEI |
| FOXI3 | 146 | PPYSYALIAMAIQSAPEKRLTLSEI | FOXO1 | 19 | PPYSYIALIAMAQSSPGQRATLSEI |
| FOXJ1 | 122 | PPYSYATLICMAMQASKATKITLSAI | | | |

Abb. 34 Alignment der Aminosäuresequenz eines Teilbereiches der Forkhead Box verschiedener Proteine der Forkhead-Familie. Rot markiert ist der Serinrest, welcher bei Patientin P13-3 mutiert ist. Eingehrahmt sind Unterklassen mit konserviertem Serin-Rest. Das Alignment wurde durchgeführt mit *ExPASy SIM – Alignment tool for protein sequences* (<http://web.expasy.org/sim/>).

Castanet et al. (2002) konnten bereits zeigen, dass eine Mutation mit daraus folgender Serin zu Asparagin Substitution innerhalb der Forkhead Box eines FOX-Proteins zur Spaltbildung führen kann. Sie wiesen eine solche Punktmutation im FOXE1-Gen bei einem Patienten mit isolierter Gaumenspalte im Rahmen eines kongenitalen Hypothyreoidismus-Syndroms nach. Hierbei trat die Erkrankung jedoch erst bei dem Patienten phänotypisch auf, welcher die Mutation in homozygoter Form trug. Die heterozygoten Eltern waren nicht betroffen.

Die Patientin 13-3 der vorliegenden Studie ist Trägerin der Mutation in heterozygoter Form. Die Untersuchung beider Elternteile erbrachte jeweils einen homozygoten Wildtypstatus, so dass von einer Neumutation beim Kind ausgegangen werden muss. Eine funktionelle Relevanz der Mutation, zum Beispiel im Sinne einer verminderten DNA-Bindung des FOXF2-Proteins, kommt in Betracht. Es ist bekannt, dass durch Gen-Dosis-Effekte die heterozygote Ausprägung eines Allels für die Gesamtfunktion des Proteins unzureichend sein kann und zu verschiedenen Erkrankungen führt (Haploinsuffizienz). Ein Beispiel einer Erkrankung, die durch heterozygote Mutationen hervorgerufen wird, ist das CHARGE-Syndrom. Es resultiert aus meist sporadisch auftretenden Mutationen im CHD7-Gen (Bergman et al., 2012). Weiterhin konnte an Mäusen bereits der pathogene Einfluss heterozygoter Mutationen im Foxf2-Gen dargestellt werden (McKeone et al., 2011). Dabei verursachen verschiedene Varianten, die anders als die in der vorliegenden Studie vorgestellte Substitution außerhalb der Forkhead Box liegen, eine mesenchymale Dysgenese des vorderen Segments (ASD), eine Augenfehlbildung. Auch hinsichtlich der Ausbildung von nicht-syndromalen LKGS konnte bereits eine Assoziation zu einem heterozygoten SNP im PAX9-Gen ermittelt werden (Lee et al., 2012).

Zahlreiche voneinander unabhängige Mutationen können einen gleichen Phänotyp auslösen. So ist zusammenfassend denkbar, dass es sich bei der Mutation c.344G→A unserer Studie um eine so genannte „private Mutation“ handelt, die nicht für eine große Zahl von LKGS ursächlich ist, sondern nur in Einzelfällen bzw. diesem einen Fall zur Genese der Spalte beitrug. Um die Auswirkungen einer Mutation an dieser Position genauer zu charakterisieren sind nachfolgende funktionelle Studien, auch im Hinblick auf mögliche zusätzlich erforderliche Mutationen in hier nicht untersuchten Genen, nötig.

Eine zweite seltene missense Mutation konnte bei einem Patienten (P43) mit beidseitiger LKGS nachgewiesen werden. Hierbei erfolgte eine heterozygote Substitution eines Cytosins gegen ein Adenin an Position c.1177 im zweiten Exon

des FOXF2-Gens. Auf Proteinebene folgt aus dieser Transversion ein Austausch der Aminosäuren Leucin gegen Methionin. Beides sind unpolare, neutrale Aminosäuren, die sich aufgrund ihrer Eigenschaften wie Molekülvolumen und chemischer Zusammensetzung sehr ähnlich sind (Strachan & Read, 2005). Solche konservativen Substitutionen bleiben häufig ohne Auswirkungen auf das fertige Protein. Trotzdem sind in der Literatur seltene Fälle der Assoziation eines heterozygoten Leucin gegen Methionin Austausches zu Krankheitsphänotypen nachgewiesen, so zum Beispiel die L289M Substitution im PRODH-Gen zu Hyperprolinämie bei Schizophreniepatienten (Jacquet et al., 2002). Ein weiteres Beispiel ist die L84M Substitution im MAD2L1-Gen, die durch Auswirkungen auf die Protein-Protein-Bindungsfähigkeit die Anfälligkeit für Lungenkrebs steigern soll (Guo et al., 2010).

Die hier vorgestellte Mutation c.1177C→A wurde weder im Kontrollkollektiv noch im Untersuchungsgut von Jochumsen et al. (2008) beobachtet. Um die Relevanz dieser Veränderung beurteilen zu können, müssen sich zusätzliche Untersuchungen anschließen. Beispielsweise könnte durch eine Familienanalyse festgestellt werden, ob sich die Mutation auch in gesunden Verwandten findet oder tatsächlich nur der Patient Träger der Variante ist.

Die vierte Punktmutation c.1272C→T wurde bei zwei gesunden Kontrollpersonen im zweiten Exon des FOXF2-Gens ermittelt. Es handelt sich um eine Cytosin zu Thymin Transition ohne Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz. Diese stumme Mutation trat somit mit einer Häufigkeit von 1,9% in der Kontrollgruppe auf, was auf einen Polymorphismus schließen lässt. In der Studie von Jochumsen et al. (2008) wurde dieser SNP sowohl bei einem Patienten als auch bei einer Normalkontrolle ermittelt. Die Untersuchung eines größeren Kontrollkollektives könnte Aufschluss über die tatsächliche Frequenz und geeignete Zuordnung zur Kategorie Polymorphismus oder seltene Varianten (Häufigkeit <1%) geben.

Das Exon 2 des FOXF2-Gens codiert für die funktionell wichtige Aktivierungsdomäne 1, wobei der SNP c.1272C→T in dessen zweiten Codon lokalisiert ist (vgl. Abb. 35). Beide Träger dieser Mutation wiesen zusätzlich den Polymorphismus c.1284T→C auf, welcher gleichfalls innerhalb der AD1 liegt und ebenso eine stumme Mutation darstellt. In der Literatur sind verschiedene Krankheiten beschrieben, welche auf einer Kombination heterozygoter Polymorphismen im gleichen Gen beruhen. Ein solches Vorliegen zweier verschieden mutierter Allele eines Gens in heterozygoter Form wird als Compound Heterozygotie bezeichnet. Ein Beispiel hierfür ist das

autosomal rezessiv vererbte Louis-Bar-Syndrom (Ataxia teleangiectatica). Über 100 verschiedene Mutationen im ATM-Gen sind bekannt, welche solitär bei heterozygoten Trägern keine Symptome hervorrufen. Besitzt jedoch eine Person zwei unterschiedlich mutierte ATM-Allele, manifestiert sich das klinische Bild des Syndroms. Dabei handelt es sich jedoch nicht um stumme Mutationen, sondern um missense und nonsense Varianten, die ein verkürztes Protein, Spliceveränderungen oder gar kompletten Ausfall der Proteinexpression hervorrufen (Concannon & Gatti, 1997). Da es sich bei den hier beschriebenen Varianten um stumme Mutationen und bei den Mutationsträgern um gesunde Kontrollen handelt, ist nicht von einer Relevanz eines dieser SNPs bzw. deren Kombination bezüglich der Spaltentstehung auszugehen.

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|-----|-----|-----|-----|---------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Beginn Exon 2 → | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1172 | TG | GGA | C | TG | CCC | CGT | TAC | CAG | CAT | CAC | TCT | ACT | CCA | GTG | TGT | GAC | AGA | AAA | |
| 1222 | GAT | TTC | GTC | CTC | AAC | TTC | AAT | GGG | ATT | TCT | TCT | TTC | CAT | CCC | TCA | GCT | AG | C | |
| 1273 | GGG | TCG | TAT | TA | T | CAC | CAT | CAC | CAC | CAG | AGC | GTC | TGT | CAG | GAT | ATT | AAG | CCC | |
| 1324 | TGC | GTC | ATG | TGA | ← Ende Exon 2 | | | | | | | | | | | | | | |

| | | |
|----------|------------------------------|--------------------|
| Legende: | <u>Doppelt unterstrichen</u> | = Bereich der AD1 |
| | C | Mutation c.1177C→A |
| | C | SNP c.1272C→T |
| | T | SNP rs2293783 |

Abb. 35 Dargestellt ist die codierende Sequenz des Exon 2 des FOXF2-Gens. Gekennzeichnet sind die Positionen der in der vorliegenden Arbeit ermittelten Polymorphismen/Mutationen in Relation zur Aktivierungsdomäne 1 (AD1) nach Hellqvist et al. (1998).

5.5.4 Betrachtung des kombinierten Genotyps FOXF2

Um eine möglicherweise bei Patienten gehäuft auftretende Kombination an Mutationen innerhalb des FOXF2-Gens zu ermitteln, wurden die Sequenzvariationen gemeinsam betrachtet. Bei keinem der Probanden konnten mehr als drei Polymorphismen nachgewiesen werden. Für die Patientin 13-3, welche die seltene Mutation c.344G→A trägt, konnten nicht alle Analysen durchgeführt werden. Somit lässt sich hier keine Aussage treffen, ob diese Mutation zum Beispiel im Rahmen einer Compound Heterozygotie Einfluss auf die Spaltbildung hat. Patient 43, Träger der Mutation c.1177C→A, wies zusätzlich die Insertion eines GGC-Tripletts an Position c.904 auf. Da es sich hierbei um den in der vorliegenden Studie am häufigsten beobachteten Polymorphismus handelt, welcher auch bei ca. 50% der

Kontrollen auftrat, ergibt sich kein Hinweis auf eine tatsächliche Relevanz zur LKGS-Erkrankung im Zusammenhang mit der Mutation c.1177C→A.

Die zusätzlichen Tripletts der beiden Längenpolymorphismen konnten in Kombination nur bei einem Patienten nachgewiesen werden. Dem entgegen wiesen drei Kontrollpersonen diese Konstellation auf. Daher kann bei einer Verlängerung des Proteins durch diese Polymorphismen von einer Variante ohne funktionelle Relevanz ausgegangen werden. Im Ganzen betrachtet konnte im Patientenkollektiv keine Kombination ermittelt werden, die nicht auch im Kontrollkollektiv zu finden war. Weiterhin zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der Genotypenverteilung der Kombination aus den häufig auftretenden Polymorphismen rs34317327 und rs2293783 zwischen Patientengruppe und Kontrollgruppe.

Für acht der zehn betroffenen Kinder, deren Eltern zusätzlich untersucht wurden, konnten die Haplotypen aus den FOXF2-Varianten erstellt werden. Daraus ließe sich eine gemeinsame Vererbung mehrerer Polymorphismen auf einem Chromosom erkennen. In den drei Fällen, in denen das Kind Träger zweier Polymorphismen war, wurden diese auch gemeinsam auf einem Chromosom vererbt. Insgesamt wurde ein seltenes Allel häufiger von der Mutter als von Vater vererbt. Weitere Analysen, auch an gesunden Kontrollen, müssten klären, ob der maternale Einfluss tatsächlich höher ist und ob eine Diskrepanz der Vererbungswahrscheinlichkeit verschiedener Allele in der deutschen Population Wert für die Krankheitsentstehung hat.

5.6 Gesamtschau aller ermittelten Sequenzvarianten

Im Hinblick auf eine überzufällig häufige Kombination der nachgewiesenen Polymorphismen bzw. Mutationen bei den Patienten im Vergleich zu den Kontrollen konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

Um zu prüfen, ob bestimmte Merkmale an verschiedenen untersuchten Loci gemeinsam von den Eltern an ihre betroffenen Kinder vererbt wurden, folgte eine Betrachtung der familienbasierten Ergebnisse in der Gesamtschau.

Das Kind der Familie 13 (Abb.31h) ist Träger von zwei seltenen SNPs. Einmal handelt es sich, wie in Kapitel 4.2.2.3 ausführlich erklärt, um eine Punktmutation an der Position der letzten Base des Introns (Pos. -1) im TGFβ3-Gen. Diese wurde vom gesunden Vater auf das betroffene Kind vererbt. Zum anderen findet sich bei diesem Kind die heterozygote Substitution G→A an Position c.344 des FOXF2-Gens, welche keines der beiden Elternteile aufweist. Bei dieser missense Mutation handelt sich um

eine spontane Veränderung. Die gleichfalls betroffene Mutter vererbte nur das seltene Allel $TGF\alpha$ - $\Delta 4bp$. Da der gesunde Vater die $TGF\beta 3$ -Mutation aufwies und die erkrankte Mutter die $c.344G \rightarrow A$ Variante nicht besitzt, lässt sich kein Zusammenhang zwischen den genetischen Veränderungen des Kindes herleiten.

In Zusammenschau mit den verbleibenden Familien kann zusammenfassend gesagt werden, dass keine gehäufte Transmission von Polymorphismen in den Transforming Growth Factor-Genen und dem $FOXF2$ -Gen zu beobachten war.

5.7 Schlussfolgerung und Ausblick

Trotz langjähriger Forschung und der Gewissheit einer erblichen Komponente an der Entstehung von LKGS ist bisher wenig über die genetischen Ursachen bekannt.

Bisherige Studien erbrachten inkonsistente Ergebnisse. So auch Untersuchungen zum Einfluss unterschiedlicher Polymorphismen der Kandidatengene $TGF\alpha$ und $TGF\beta$. Dies wird häufig auf ein unzureichend geprüfetes Kontrollkollektiv oder Populationseffekte zurückgeführt. Zudem sind die Patientenkollektive häufig sehr heterogen, da weder exogene Einflüsse noch die unterschiedlichen Spaltarten getrennt beachtet werden. In der vorliegenden Studie wurde eine rein mitteldeutsche, kaukasische Kontrollgruppe gewählt. Somit lassen sich Populationseffekte zur Patientengruppe gleichen Ursprungs ausschließen. Die bereits von einigen Arbeitsgruppen beschriebene fehlende Signifikanz der untersuchten Polymorphismen der TGFs in kaukasischen Kollektiven konnte so bestätigt werden. Dies schließt jedoch nicht aus, dass diese Polymorphismen in Kombination mit weiteren, von uns nicht untersuchten Sequenzvarianten oder Umweltfaktoren, Anteil an kraniofazialen Fehlbildungen haben. Weiterhin wurden die Spaltarten nach ihren Entstehungsmechanismen in $LK \pm GS$ und isolierte GS unterschieden und das Geschlecht der Spaltträger einbezogen, wobei keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der Polymorphismen ermittelt werden konnten. In zukünftigen Studien könnten weitere Unterteilungen nach Lateralität oder Schweregrad durchgeführt werden, um genetische Varianten zu eruieren, die möglicherweise nur für einen bestimmten Spalttyp verantwortlich sind.

Keine der von uns ermittelten Mutationen bzw. keiner der Polymorphismen im $FOXF2$ -Gen führte zu einer Insertion eines Stoppcodons oder einer Leserahmenverschiebung, so dass kein verkürztes oder gar vollkommen funktionsunfähiges Protein zu erwarten ist. Trotz der Tatsache, dass in der

vorliegenden Arbeit keine eindeutige Assoziation dieses Gens zur Spaltbildung nachgewiesen werden konnte, ist nicht auszuschließen, dass ein kompletter Verlust des Genproduktes beim Menschen – wie bei der Maus (Wang et al., 2003) – das Auftreten einer Spalte im sekundären Gaumen zur Folge hat.

Die vorliegende Studie umfasste keine funktionellen Untersuchungen der Proteine. Diese müssten folgen um die Konsequenzen der Mutationen, welche nur bei Patienten auftraten, abschätzen zu können. Expressionsstudien an tierischen Geweben (heterologe Expression) können Aufschluss über das Verhalten mutationstragender Proteine geben. Weitere proteinbiochemische Untersuchungen wie Co-Immunpräzipitation, FRET (Förster-Resonanzenergietransfer) oder ChIP-Assays (Chromatin-Immunpräzipitation) und EMSA-Analysen (Electrophoretic Mobility Shift Assay) zeigen mögliche Veränderungen in der Protein-Protein- oder Protein-DNA-Bindungsfähigkeit. Weiterhin kann mit Methoden wie dem Exon-Trapping ein möglicher Einfluss der genetischen Veränderungen auf das Spliceverhalten untersucht werden. In der vorliegenden Studie wurden Sequenzveränderungen untersucht, nicht aber epigenetische Veränderungen der DNA. Dass derartige Modifikationen, wie Methylierungsfehler, zur Spaltbildung führen können, ist bereits in der Literatur belegt (Kuriyama et al., 2008) und sollte genauer analysiert werden.

Da man annimmt, dass es sich bei der Genese von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten um einen komplexen, polygenen Entstehungsmechanismus handelt und der Einfluss exogener Faktoren unumstritten ist, sollten die untersuchten Probanden, soweit dies möglich ist, hinsichtlich ihrer Lebensumstände geprüft werden und zukünftige Forschungen besonders auf Gen-Gen- und Gen-Umwelt-Interaktionen fokussieren. Es ist wahrscheinlich, dass die Krankheitsentstehung von einer Kombination mehrerer kleiner genetischer Veränderungen und Expressionsvarianten abhängt, die einzeln betrachtet keine pathogenen Auswirkungen haben. In der vorliegenden Arbeit wurde bereits untersucht, ob einzelne Polymorphismen der Gene $TGF\alpha$ und $TGF\beta$ mit Veränderungen im $FOXF2$ -Gen korrespondieren und ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Spalte darstellen. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen ermittelt werden. Dies sind jedoch nur drei Gene in der langen Liste von Kandidatengenen. Durch innovative Untersuchungsansätze wie Next-Generation Sequencing und genomweite Assoziationsanalysen ergeben sich immer wieder neue Hinweise auf potenzielle Suszeptibilitätsgene, deren Einfluss auf die Gaumenentwicklung und Spaltbildung in molekulargenetischen und funktionellen Studien überprüft werden muss.

6 Literaturverzeichnis

Abrahams, Y., Laguet, M.J., Prince, S., and Collins, M. (2013). Polymorphisms within the COL5A1 3'-UTR that alters mRNA structure and the MIR608 gene are associated with Achilles tendinopathy. *Annals of human genetics* 77, 204-214.

Ahmed, S., Liu, C.-C., and Nawshad, A. (2007). Mechanisms of palatal epithelial seam disintegration by transforming growth factor (TGF) β 3. *Developmental Biology* 309, 193-207.

Aitola, M., Carlsson, P., Mahlapuu, M., Enerback, S., and Peltö-Huikko, M. (2000). Forkhead transcription factor FoxF2 is expressed in mesodermal tissues involved in epithelio-mesenchymal interactions. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 218, 136-149.

Andrew, S.E., Goldberg, Y.P., Kremer, B., Telenius, H., Theilmann, J., Adam, S., Starr, E., Squitieri, F., Lin, B., Kalchman, M.A., *et al.* (1993). The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nat Genet* 4, 398-403.

Ardinger, H.H., Buetow, K.H., Bell, G.I., Bardach, J., VanDemark, D.R., and Murray, J.C. (1989). Association of genetic variation of the transforming growth factor-alpha gene with cleft lip and palate. *Am J Hum Genet* 45, 348-353.

Aretz, S., Uhlhaas, S., Sun, Y., Pagenstecher, C., Mangold, E., Caspari, R., Moslein, G., Schulmann, K., Propping, P., and Friedl, W. (2004). Familial adenomatous polyposis: aberrant splicing due to missense or silent mutations in the APC gene. *Human mutation* 24, 370-380.

Barrandon, Y., and Green, H. (1987). Cell migration is essential for sustained growth of keratinocyte colonies: the roles of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor. *Cell* 50, 1131-1137.

Barrett, L.W., Fletcher, S., and Wilton, S.D. (2012). Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 69, 3613-3634.

Basart, A.M., Qian, J.F., May, E., and Murray, J.C. (1994). A PCR method for detecting polymorphism in the TGFA gene. *Hum Mol Genet* 3, 678.

Beaty, T.H., Murray, J.C., Marazita, M.L., Munger, R.G., Ruczinski, I., Hetmanski, J.B., Liang, K.Y., Wu, T., Murray, T., Fallin, M.D., *et al.* (2010). A genome-wide association study of cleft lip with and without cleft palate identifies risk variants near MAFB and ABCA4. *Nat Genet* 42, 525-529.

Beaty, T.H., Wang, H., Hetmanski, J.B., Fan, Y.T., Zeiger, J.S., Liang, K.Y., Chiu, Y.F., Vanderkolk, C.A., Seifert, K.C., Wulfsberg, E.A., *et al.* (2001). A case-control study of nonsyndromic oral clefts in Maryland. *Annals of epidemiology* 11, 434-442.

Beffagna, G., Occhi, G., Nava, A., Vitiello, L., Ditadi, A., Basso, C., Baucé, B., Carraro, G., Thiene, G., Towbin, J.A., *et al.* (2005). Regulatory mutations in transforming growth factor-beta3 gene cause arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 1. *Cardiovascular research* 65, 366-373.

Bender, P.L. (2000). Genetics of cleft lip and palate. *Journal of pediatric nursing* 15, 242-249.

- Bennett, C.L., Brunkow, M.E., Ramsdell, F., O'Briant, K.C., Zhu, Q., Fuleihan, R.L., Shigeoka, A.O., Ochs, H.D., and Chance, P.F. (2001). A rare polyadenylation signal mutation of the FOXP3 gene (AAUAAA-->AAUGAA) leads to the IPEX syndrome. *Immunogenetics* 53, 435-439.
- Bergman, J.E., Janssen, N., van der Sloot, A.M., de Walle, H.E., Schoots, J., Rendtorff, N.D., Tranebjaerg, L., Hoefsloot, L.H., van Ravenswaaij-Arts, C.M., and Hofstra, R.M. (2012). A novel classification system to predict the pathogenic effects of CHD7 missense variants in CHARGE syndrome. *Human mutation* 33, 1251-1260.
- Bickeboller, H., and Clerget-Darpoux, F. (1995). Statistical properties of the allelic and genotypic transmission/disequilibrium test for multiallelic markers. *Genetic epidemiology* 12, 865-870.
- Birnbaum, S., Ludwig, K.U., Reutter, H., Herms, S., Steffens, M., Rubini, M., Baluardo, C., Ferrian, M., Almeida de Assis, N., Alblas, M.A., *et al.* (2009). Key susceptibility locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on chromosome 8q24. *Nat Genet* 41, 473-477.
- Blixt, A., Mahlapuu, M., Bjursell, C., Darnfors, C., Johannesson, T., Enerback, S., and Carlsson, P. (1998). The two-exon gene of the human forkhead transcription factor FREAC-2 (FKHL6) is located at 6p25.3. *Genomics* 53, 387-390.
- Bottner, M., Kriegstein, K., and Unsicker, K. (2000). The transforming growth factor-betas: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions. *Journal of neurochemistry* 75, 2227-2240.
- Brito, L.A., Cruz, L.A., Rocha, K.M., Barbara, L.K., Silva, C.B., Bueno, D.F., Agüena, M., Bertola, D.R., Franco, D., Costa, A.M., *et al.* (2011). Genetic contribution for non-syndromic cleft lip with or without cleft palate (NS CL/P) in different regions of Brazil and implications for association studies. *Am J Med Genet A* 155A, 1581-1587.
- Bulleit, R.F., and Zimmerman, E.F. (1985). The influence of the epithelium on palate shelf reorientation. *Journal of embryology and experimental morphology* 88, 265-279.
- Burdett, D.N., Waterfield, J.D., and Shah, R.M. (1988). Vertical development of the secondary palate in hamster embryos following exposure to 6-mercaptopurine. *Teratology* 37, 591-597.
- Callahan, N., Modesto, A., Deeley, K., Meira, R., and Vieira, A.R. (2009). Transforming growth factor- α gene (TGFA), human tooth agenesis, and evidence of segmental uniparental isodisomy. *European journal of oral sciences* 117, 20-26.
- Cameron, I.L., and Hardman, W.E. (2002). Paracrine action of transforming growth factor- α in rectal crypt epithelium of humans. *Cell biology international* 26, 1029-1034.
- Carev, D., Saraga, M., and Saraga-Babic, M. (2008). Expression of intermediate filaments, EGF and TGF- α in early human kidney development. *Journal of molecular histology* 39, 227-235.
- Carinci, F., Pezzetti, F., Scapoli, L., Martinelli, M., Carinci, P., and Tognon, M. (2000). Genetics of nonsyndromic cleft lip and palate: a review of international studies and data regarding the Italian population. *Cleft Palate Craniofac J* 37, 33-40.
- Carlsson, P., and Mahlapuu, M. (2002). Forkhead transcription factors: key players in development and metabolism. *Dev Biol* 250, 1-23.

- Carmichael, S.L., and Shaw, G.M. (1999). Maternal corticosteroid use and risk of selected congenital anomalies. *American journal of medical genetics* 86, 242-244.
- Carre, A., Castanet, M., Sura-Trueba, S., Szinnai, G., Van Vliet, G., Trochet, D., Amiel, J., Leger, J., Czernichow, P., Scotet, V., *et al.* (2007). Polymorphic length of FOXE1 alanine stretch: evidence for genetic susceptibility to thyroid dysgenesis. *Human genetics* 122, 467-476.
- Castanet, M., Park, S.M., Smith, A., Bost, M., Leger, J., Lyonnet, S., Pelet, A., Czernichow, P., Chatterjee, K., and Polak, M. (2002). A novel loss-of-function mutation in TTF-2 is associated with congenital hypothyroidism, thyroid agenesis and cleft palate. *Hum Mol Genet* 11, 2051-2059.
- Chang, H., Brown, C.W., and Matzuk, M.M. (2002). Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocr Rev* 23, 787-823.
- Chao, H.K., Hsiao, K.J., and Su, T.S. (2001). A silent mutation induces exon skipping in the phenylalanine hydroxylase gene in phenylketonuria. *Human genetics* 108, 14-19.
- Chen, J.M., Ferec, C., and Cooper, D.N. (2006). A systematic analysis of disease-associated variants in the 3' regulatory regions of human protein-coding genes II: the importance of mRNA secondary structure in assessing the functionality of 3' UTR variants. *Human genetics* 120, 301-333.
- Chenevix-Trench, G., Jones, K., Green, A., and Martin, N. (1991). Further evidence for an association between genetic variation in transforming growth factor alpha and cleft lip and palate. *Am J Hum Genet* 48, 1012-1013.
- Christensen, K., Olsen, J., Norgaard-Pedersen, B., Basso, O., Stovring, H., Milhollin-Johnson, L., and Murray, J.C. (1999). Oral clefts, transforming growth factor alpha gene variants, and maternal smoking: a population-based case-control study in Denmark, 1991-1994. *American journal of epidemiology* 149, 248-255.
- Cirillo, L.A., and Zaret, K.S. (2007). Specific interactions of the wing domains of FOXA1 transcription factor with DNA. *Journal of molecular biology* 366, 720-724.
- Clark, K.L., Halay, E.D., Lai, E., and Burley, S.K. (1993). Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. *Nature* 364, 412-420.
- Cohen, M.M., Jr. (2003). TGF beta/Smad signaling system and its pathologic correlates. *Am J Med Genet A* 116A, 1-10.
- Concannon, P., and Gatti, R.A. (1997). Diversity of ATM gene mutations detected in patients with ataxia-telangiectasia. *Human mutation* 10, 100-107.
- Crisponi, L., Deiana, M., Loi, A., Chiappe, F., Uda, M., Amati, P., Bisceglia, L., Zelante, L., Nagaraja, R., Porcu, S., *et al.* (2001). The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nat Genet* 27, 159-166.
- D'Angelo, M., and Greene, R.M. (1991). Transforming growth factor-beta modulation of glycosaminoglycan production by mesenchymal cells of the developing murine secondary palate. *Dev Biol* 145, 374-378.
- Davies, A.F., Stephens, R.J., Olavesen, M.G., Heather, L., Dixon, M.J., Magee, A., Flinter, F., and Ragoussis, J. (1995). Evidence of a locus for orofacial clefting on human chromosome 6p24 and STS content map of the region. *Hum Mol Genet* 4, 121-128.

DeRoo, L.A., Wilcox, A.J., Drevon, C.A., and Lie, R.T. (2008). First-trimester maternal alcohol consumption and the risk of infant oral clefts in Norway: a population-based case-control study. *American journal of epidemiology* 168, 638-646.

Derynck, R. (1986). Transforming growth factor- α : structure and biological activities. *Journal of cellular biochemistry* 32, 293-304.

Derynck, R., Lindquist, P.B., Lee, A., Wen, D., Tamm, J., Graycar, J.L., Rhee, L., Mason, A.J., Miller, D.A., Coffey, R.J., *et al.* (1988). A new type of transforming growth factor- β , TGF- β 3. *The EMBO journal* 7, 3737-3743.

Derynck, R., Roberts, A.B., Winkler, M.E., Chen, E.Y., and Goeddel, D.V. (1984). Human transforming growth factor- α : precursor structure and expression in *E. coli*. *Cell* 38, 287-297.

Desrosiers, A.E., 3rd, Kawamoto, H.K., Katchikian, H.V., Jarrahy, R., and Bradley, J.P. (2009). Microform cleft lip repair with intraoral muscle interdigitation. *Annals of plastic surgery* 62, 640-644.

Dixon, M.J., Garner, J., and Ferguson, M.W. (1991). Immunolocalization of epidermal growth factor (EGF), EGF receptor and transforming growth factor α (TGF α) during murine palatogenesis in vivo and in vitro. *Anatomy and embryology* 184, 83-91.

Dixon, M.J., Marazita, M.L., Beaty, T.H., and Murray, J.C. (2011). Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nature reviews Genetics* 12, 167-178.

Dudas, M., Kim, J., Li, W.Y., Nagy, A., Larsson, J., Karlsson, S., Chai, Y., and Kaartinen, V. (2006). Epithelial and ectomesenchymal role of the type I TGF- β receptor ALK5 during facial morphogenesis and palatal fusion. *Dev Biol* 296, 298-314.

Dudas, M., Nagy, A., Laping, N.J., Moustakas, A., and Kaartinen, V. (2004). Tgf- β 3-induced palatal fusion is mediated by Alk-5/Smad pathway. *Developmental Biology* 266, 96-108.

Eiberg, H., Bixler, D., Nielsen, L.S., Conneally, P.M., and Mohr, J. (1987). Suggestion of linkage of a major locus for nonsyndromic orofacial cleft with F13A and tentative assignment to chromosome 6. *Clinical genetics* 32, 129-132.

ENCODE, P.C., Dunham, I., Kundaje, A., Aldred, S.F., Collins, P.J., Davis, C.A., Doyle, F., Epstein, C.B., Fietze, S., Harrow, J., *et al.* (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 489, 57-74.

EUROCAT, W.G. (2002). EUROCAT Special Report: EUROCAT and orofacial clefts: the epidemiology of orofacial clefts in 30 European regions. EUROCAT Central Registry, University of Ulster, University of Ferrara, Italy, and the CNR Institute of Clinical Physiology, Pisa, Italy (www.eurocat.ulster.ac.uk/pubdata).

Feng, H., Sassani, R., Bartlett, S.P., Lee, A., Hecht, J.T., Malcolm, S., Winter, R.M., Vintiner, G.M., Buetow, K.H., and Gasser, D.L. (1994). Evidence, from family studies, for linkage disequilibrium between TGFA and a gene for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Am J Hum Genet* 55, 932-936.

Ferguson, M.W. (1987). Palate development: mechanisms and malformations. *Irish journal of medical science* 156, 309-315.

Ferguson, M.W. (1988). Palate development. *Development* 103 Suppl, 41-60.

Fisher, R.A. (1922). On the Mathematical Foundations of Theoretical Statistics. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series A, Containing Papers of a Mathematical or Physical Character* 222, 309-368.

Fitchett, J.E., and Hay, E.D. (1989). Medial edge epithelium transforms to mesenchyme after embryonic palatal shelves fuse. *Dev Biol* 131, 455-474.

Fitzpatrick, D.R., Denhez, F., Kondaiah, P., and Akhurst, R.J. (1990). Differential expression of TGF beta isoforms in murine palatogenesis. *Development* 109, 585-595.

Gato, A., Martinez, M.L., Tudela, C., Alonso, I., Moro, J.A., Formoso, M.A., Ferguson, M.W.J., and Martínez-Álvarez, C. (2002). TGF- β -Induced Chondroitin Sulphate Proteoglycan Mediates Palatal Shelf Adhesion. *Developmental Biology* 250, 393-405.

Gecz, J., Gedeon, A.K., Sutherland, G.R., and Mulley, J.C. (1996). Identification of the gene FMR2, associated with FRAXE mental retardation. *Nat Genet* 13, 105-108.

Gorlin, R.J., Cohen, M.M., and Hennekam, R.C.M. (2001). Syndromes of the head and neck, 4. ed edn (Oxford [u.a.]: Oxford Univ. Press).

Grant, S.F., Wang, K., Zhang, H., Glaberson, W., Annaiah, K., Kim, C.E., Bradfield, J.P., Glessner, J.T., Thomas, K.A., Garriss, M., *et al.* (2009). A genome-wide association study identifies a locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on 8q24. *The Journal of pediatrics* 155, 909-913.

Grosen, D., Bille, C., Petersen, I., Skytthe, A., Hjelmberg, J., Pedersen, J.K., Murray, J.C., and Christensen, K. (2011). Risk of oral clefts in twins. *Epidemiology* 22, 313-319.

Grymek, K., Lukasiwicz, S., Faron-Gorecka, A., Tworzydło, M., Polit, A., and Dziedzicka-Wasylewska, M. (2009). Role of silent polymorphisms within the dopamine D1 receptor associated with schizophrenia on D1-D2 receptor hetero-dimerization. *Pharmacological reports* : PR 61, 1024-1033.

Guo, Y., Zhang, X., Yang, M., Miao, X., Shi, Y., Yao, J., Tan, W., Sun, T., Zhao, D., Yu, D., *et al.* (2010). Functional evaluation of missense variations in the human MAD1L1 and MAD2L1 genes and their impact on susceptibility to lung cancer. *Journal of medical genetics* 47, 616-622.

He, F., Xiong, W., Yu, X., Espinoza-Lewis, R., Liu, C., Gu, S., Nishita, M., Suzuki, K., Yamada, G., Minami, Y., *et al.* (2008). Wnt5a regulates directional cell migration and cell proliferation via Ror2-mediated noncanonical pathway in mammalian palate development. *Development* 135, 3871-3879.

Hecht, J.T., Wang, Y.P., Blanton, S.H., Michels, V.V., and Daiger, S.P. (1991). Cleft lip and palate: no evidence of linkage to transforming growth factor alpha. *Am J Hum Genet* 49, 682-686.

Hellqvist, M., Mahlapuu, M., Blixt, A., Enerback, S., and Carlsson, P. (1998). The human forkhead protein FREAC-2 contains two functionally redundant activation domains and interacts with TBP and TFIIB. *J Biol Chem* 273, 23335-23343.

Holder, S.E., Vintiner, G.M., Farren, B., Malcolm, S., and Winter, R.M. (1992). Confirmation of an association between RFLPs at the transforming growth factor-alpha locus and non-syndromic cleft lip and palate. *Journal of medical genetics* 29, 390-392.

Holmes, L.B., Baldwin, E.J., Smith, C.R., Habecker, E., Glassman, L., Wong, S.L., and Wyszynski, D.F. (2008). Increased frequency of isolated cleft palate in infants exposed to lamotrigine during pregnancy. *Neurology* 70, 2152-2158.

Hung, T., Mak, K., and Fong, K. (1990). A specificity enhancer for polymerase chain reaction. *Nucleic acids research* 18, 4953.

Iamaroon, A., Tait, B., and Diewert, V.M. (1996). Cell Proliferation and Expression of EGF, TGF- α , and EGF Receptor in the Developing Primary Palate. *Journal of Dental Research* 75, 1534-1539.

Ichikawa, E., Watanabe, A., Nakano, Y., Akita, S., Hirano, A., Kinoshita, A., Kondo, S., Kishino, T., Uchiyama, T., Niikawa, N., *et al.* (2006). PAX9 and TGFB3 are linked to susceptibility to nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Japanese: population-based and family-based candidate gene analyses. *Journal of human genetics* 51, 38-46.

Iordanskaia, T., and Nawshad, A. (2011). Mechanisms of transforming growth factor beta induced cell cycle arrest in palate development. *Journal of cellular physiology* 226, 1415-1424.

IPDTC, W.G. (2011). Prevalence at Birth of Cleft Lip With or Without Cleft Palate: Data From the International Perinatal Database of Typical Oral Clefts (IPDTC). *Cleft Palate Craniofac J* 48, 66-81.

Jacquet, H., Raux, G., Thibaut, F., Hecketsweiler, B., Houy, E., Demilly, C., Haouzir, S., Allio, G., Fouldrin, G., Drouin, V., *et al.* (2002). PRODH mutations and hyperprolinemia in a subset of schizophrenic patients. *Hum Mol Genet* 11, 2243-2249.

Jara, L., Blanco, R., Chiffelle, I., Palomino, H., and Carreno, H. (1995). Association between alleles of the transforming growth factor alpha locus and cleft lip and palate in the Chilean population. *American journal of medical genetics* 57, 548-551.

Jin, J.Z., and Ding, J. (2006). Analysis of cell migration, transdifferentiation and apoptosis during mouse secondary palate fusion. *Development* 133, 3341-3347.

Jochumsen, U., Werner, R., Miura, N., Richter-Unruh, A., Hiort, O., and Holterhus, P.M. (2008). Mutation analysis of FOXF2 in patients with disorders of sex development (DSD) in combination with cleft palate. *Sexual development : genetics, molecular biology, evolution, endocrinology, embryology, and pathology of sex determination and differentiation* 2, 302-308.

Jones, M.C. (1988). Etiology of facial clefts: prospective evaluation of 428 patients. *The Cleft palate journal* 25, 16-20.

Jonsson, T., Atwal, J.K., Steinberg, S., Snaedal, J., Jonsson, P.V., Bjornsson, S., Stefansson, H., Sulem, P., Gudbjartsson, D., Maloney, J., *et al.* (2012). A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature* 488, 96-99.

Jugessur, A., Lie, R.T., Wilcox, A.J., Murray, J.C., Taylor, J.A., Saugstad, O.D., Vindenes, H.A., and Abyholm, F. (2003). Variants of developmental genes (TGFA, TGFB3, and MSX1) and their associations with orofacial clefts: a case-parent triad analysis. *Genetic epidemiology* 24, 230-239.

Jugessur, A., Shi, M., Gjessing, H.K., Lie, R.T., Wilcox, A.J., Weinberg, C.R., Christensen, K., Boyles, A.L., Daack-Hirsch, S., Nguyen, T.T., *et al.* (2010). Maternal genes and facial

clefts in offspring: a comprehensive search for genetic associations in two population-based cleft studies from Scandinavia. *PloS one* 5, e11493.

Jugessur, A., Shi, M., Gjessing, H.K., Lie, R.T., Wilcox, A.J., Weinberg, C.R., Christensen, K., Boyles, A.L., Daack-Hirsch, S., Trung, T.N., *et al.* (2009). Genetic determinants of facial clefting: analysis of 357 candidate genes using two national cleft studies from Scandinavia. *PloS one* 4, e5385.

Kaartinen, V., Voncken, J.W., Shuler, C., Warburton, D., Bu, D., Heisterkamp, N., and Groffen, J. (1995). Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nat Genet* 11, 415-421.

Kang, P., and Svoboda, K.K. (2002). PI-3 kinase activity is required for epithelial-mesenchymal transformation during palate fusion. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 225, 316-321.

Kaplan, E.N. (1975). The occult submucous cleft palate. *The Cleft palate journal* 12, 356-368.

Kim, M.H., Kim, H.J., Choi, J.Y., and Nahm, D.S. (2003). Transforming growth factor-beta3 gene SfaN1 polymorphism in Korean nonsyndromic cleft lip and palate patients. *Journal of biochemistry and molecular biology* 36, 533-537.

Kingsley, D.M. (1994). The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes & Development* 8, 133-146.

Kloen, P., Gebhardt, M.C., Perez-Atayde, A., Rosenberg, A.E., Springfield, D.S., Gold, L.I., and Mankin, H.J. (1997). Expression of transforming growth factor-beta (TGF-beta) isoforms in osteosarcomas: TGF-beta3 is related to disease progression. *Cancer* 80, 2230-2239.

Knight, A.S., Schutte, B.C., Jiang, R., and Dixon, M.J. (2006). Developmental expression analysis of the mouse and chick orthologues of IRF6: the gene mutated in Van der Woude syndrome. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 235, 1441-1447.

Kondo, S., Schutte, B.C., Richardson, R.J., Bjork, B.C., Knight, A.S., Watanabe, Y., Howard, E., de Lima, R.L., Daack-Hirsch, S., Sander, A., *et al.* (2002). Mutations in IRF6 cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Nat Genet* 32, 285-289.

Kosaki, K., Bassi, M.T., Kosaki, R., Lewin, M., Belmont, J., Schauer, G., and Casey, B. (1999). Characterization and mutation analysis of human LEFTY A and LEFTY B, homologues of murine genes implicated in left-right axis development. *Am J Hum Genet* 64, 712-721.

Kothapalli, R., Buyuksal, I., Wu, S.Q., Chegini, N., and Tabibzadeh, S. (1997). Detection of ebaf, a novel human gene of the transforming growth factor beta superfamily association of gene expression with endometrial bleeding. *The Journal of clinical investigation* 99, 2342-2350.

Kuriyama, M., Udagawa, A., Yoshimoto, S., Ichinose, M., Sato, K., Yamazaki, K., Matsuno, Y., Shiota, K., and Mori, C. (2008). DNA methylation changes during cleft palate formation induced by retinoic acid in mice. *Cleft Palate Craniofac J* 45, 545-551.

Lam, A.K., David, D.J., Townsend, G.C., and Anderson, P.J. (2010). Van der Woude syndrome: dentofacial features and implications for clinical practice. *Australian dental journal* 55, 51-58.

- Lan, Y., and Jiang, R. (2009). Sonic hedgehog signaling regulates reciprocal epithelial-mesenchymal interactions controlling palatal outgrowth. *Development* 136, 1387-1396.
- Laverty, H.G., Wakefield, L.M., Occleston, N.L., O'Kane, S., and Ferguson, M.W. (2009). TGF-beta3 and cancer: a review. *Cytokine & growth factor reviews* 20, 305-317.
- Lee, D.C., Rochford, R., Todaro, G.J., and Villarreal, L.P. (1985). Developmental expression of rat transforming growth factor-alpha mRNA. *Molecular and cellular biology* 5, 3644-3646.
- Lee, J.K., Park, J.W., Kim, Y.H., and Baek, S.H. (2012). Association between PAX9 single-nucleotide polymorphisms and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *The Journal of craniofacial surgery* 23, 1262-1266.
- Lehmann, O.J., Sowden, J.C., Carlsson, P., Jordan, T., and Bhattacharya, S.S. (2003). Fox's in development and disease. *Trends in Genetics* 19, 339-344.
- Letra, A., Fakhouri, W., Fonseca, R.F., Menezes, R., Kempa, I., Prasad, J.L., McHenry, T.G., Lidral, A.C., Moreno, L., Murray, J.C., *et al.* (2012). Interaction between IRF6 and TGFA genes contribute to the risk of nonsyndromic cleft lip/palate. *PloS one* 7, e45441.
- Letra, A., Menezes, R., Cooper, M.E., Fonseca, R.F., Tropp, S., Govil, M., Granjeiro, J.M., Imoehl, S.R., Mansilla, M.A., Murray, J.C., *et al.* (2011). CRISPLD2 Variants Including a C471T Silent Mutation May Contribute to Nonsyndromic Cleft Lip With or Without Cleft Palate. *Cleft Palate Craniofac J* 48, 363-370.
- Lidral, A.C., Murray, J.C., Buetow, K.H., Basart, A.M., Schearer, H., Shiang, R., Naval, A., Layda, E., Magee, K., and Magee, W. (1997). Studies of the candidate genes TGFB2, MSX1, TGFA, and TGFB3 in the etiology of cleft lip and palate in the Philippines. *Cleft Palate Craniofac J* 34, 1-6.
- Lidral, A.C., Romitti, P.A., Basart, A.M., Doetschman, T., Leysens, N.J., Daack-Hirsch, S., Semina, E.V., Johnson, L.R., Machida, J., Burds, A., *et al.* (1998). Association of MSX1 and TGFB3 with nonsyndromic clefting in humans. *Am J Hum Genet* 63, 557-568.
- Luetteke, N.C., Qiu, T.H., Peiffer, R.L., Oliver, P., Smithies, O., and Lee, D.C. (1993). TGF alpha deficiency results in hair follicle and eye abnormalities in targeted and waved-1 mice. *Cell* 73, 263-278.
- Machida, J., Yoshiura, K., Funkhauser, C.D., Natsume, N., Kawai, T., and Murray, J.C. (1999). Transforming growth factor-alpha (TGFA): genomic structure, boundary sequences, and mutation analysis in nonsyndromic cleft lip/palate and cleft palate only. *Genomics* 61, 237-242.
- Maestri, N.E., Beaty, T.H., Hetmanski, J., Smith, E.A., McIntosh, I., Wyszynski, D.F., Liang, K.Y., Duffy, D.L., and VanderKolk, C. (1997). Application of transmission disequilibrium tests to nonsyndromic oral clefts: including candidate genes and environmental exposures in the models. *American journal of medical genetics* 73, 337-344.
- Malta-Vacas, J., Chauvin, C., Goncalves, L., Nazare, A., Carvalho, C., Monteiro, C., Bagrel, D., Jean-Jean, O., and Brito, M. (2009). eRF3a/GSPT1 12-GGC allele increases the susceptibility for breast cancer development. *Oncology reports* 21, 1551-1558.
- Mangold, E., Ludwig, K.U., Birnbaum, S., Baluardo, C., Ferrian, M., Herms, S., Reutter, H., de Assis, N.A., Chawa, T.A., Mattheisen, M., *et al.* (2010). Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Nat Genet* 42, 24-26.

- Marazita, M.L., Murray, J.C., Lidral, A.C., Arcos-Burgos, M., Cooper, M.E., Goldstein, T., Maher, B.S., Daack-Hirsch, S., Schultz, R., Mansilla, M.A., *et al.* (2004). Meta-analysis of 13 genome scans reveals multiple cleft lip/palate genes with novel loci on 9q21 and 2q32-35. *Am J Hum Genet* 75, 161-173.
- Mayall, F., Fairweather, S., Wilkins, R., Chang, B., and Nicholls, R. (1999). Microsatellite abnormalities in plasma of patients with breast carcinoma: concordance with the primary tumour. *Journal of Clinical Pathology* 52, 363-366.
- McKeone, R., Vieira, H., Gregory-Evans, K., Gregory-Evans, C.Y., and Denny, P. (2011). *Foxf2*: a novel locus for anterior segment dysgenesis adjacent to the *Foxc1* gene. *PloS one* 6, e25489.
- Miri, M., Hemati, S., Safari, F., and Tavassoli, M. (2012). GGCn polymorphism of eRF3a/GSPT1 gene and breast cancer susceptibility. *Med Oncol* 29, 1581-1585.
- Mitchell, L.E., Murray, J.C., O'Brien, S., and Christensen, K. (2001). Evaluation of two putative susceptibility loci for oral clefts in the Danish population. *American journal of epidemiology* 153, 1007-1015.
- Molina-Solana, R., Yanez-Vico, R.M., Iglesias-Linares, A., Mendoza-Mendoza, A., and Solano-Reina, E. (2012). Current concepts on the effect of environmental factors on cleft lip and palate. *International journal of oral and maxillofacial surgery*.
- Moreno, L.M., Mansilla, M.A., Bullard, S.A., Cooper, M.E., Busch, T.D., Machida, J., Johnson, M.K., Brauer, D., Krahm, K., Daack-Hirsch, S., *et al.* (2009). *FOXE1* association with both isolated cleft lip with or without cleft palate, and isolated cleft palate. *Hum Mol Genet* 18, 4879-4896.
- Mossey, P.A., and Modell, B. (2012). Epidemiology of oral clefts 2012: an international perspective. *Frontiers of oral biology* 16, 1-18.
- Murata, H., Zhou, L., Ochoa, S., Hasan, A., Badiavas, E., and Falanga, V. (1997). TGF-beta3 stimulates and regulates collagen synthesis through TGF-beta1-dependent and independent mechanisms. *J Invest Dermatol* 108, 258-262.
- Murray, J.C. (2002). Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. *Clinical genetics* 61, 248-256.
- Murray, J.C., Buetow, K.H., Weber, J.L., Ludwigsen, S., Scherpbier-Heddema, T., Manion, F., Quillen, J., Sheffield, V.C., Sunden, S., Duyk, G.M., *et al.* (1994). A comprehensive human linkage map with centimorgan density. Cooperative Human Linkage Center (CHLC). *Science* 265, 2049-2054.
- Nikopensius, T., Kempa, I., Ambrozaityte, L., Jagomagi, T., Saag, M., Matuleviciene, A., Utkus, A., Krjutskov, K., Tammekivi, V., Piekuse, L., *et al.* (2011). Variation in *FGF1*, *FOXE1*, and *TIMP2* genes is associated with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology* 91, 218-225.
- Nogai, H., Rosowski, M., Grun, J., Rietz, A., Debus, N., Schmidt, G., Lauster, C., Janitz, M., Vortkamp, A., and Lauster, R. (2008). Follistatin antagonizes transforming growth factor-beta3-induced epithelial-mesenchymal transition in vitro: implications for murine palatal development supported by microarray analysis. *Differentiation; research in biological diversity* 76, 404-416.

- Ormestad, M., Astorga, J., and Carlsson, P. (2004). Differences in the embryonic expression patterns of mouse *Foxf1* and *-2* match their distinct mutant phenotypes. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 229, 328-333.
- Ormestad, M., Astorga, J., Landgren, H., Wang, T., Johansson, B.R., Miura, N., and Carlsson, P. (2006). *Foxf1* and *Foxf2* control murine gut development by limiting mesenchymal Wnt signaling and promoting extracellular matrix production. *Development* 133, 833-843.
- Orr, H.T., and Zoghbi, H.Y. (2007). Trinucleotide repeat disorders. *Annual review of neuroscience* 30, 575-621.
- Pagani, F., Raponi, M., and Baralle, F.E. (2005). Synonymous mutations in CFTR exon 12 affect splicing and are not neutral in evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 6368-6372.
- Passos-Bueno, M.R., Gaspar, D.A., Kamiya, T., Tescarollo, G., Rabanea, D., Richieri-Costa, A., Alonso, N., and Araujo, B. (2004). Transforming growth factor- α and nonsyndromic cleft lip with or without palate in Brazilian patients: Results of a large case-control study. *Cleft Palate-Cran J* 41, 387-391.
- Paulson, T.G., Wright, F.A., Parker, B.A., Russack, V., and Wahl, G.M. (1996). Microsatellite instability correlates with reduced survival and poor disease prognosis in breast cancer. *Cancer Res* 56, 4021-4026.
- Pelton, R.W., Dickinson, M.E., Moses, H.L., and Hogan, B.L. (1990). In situ hybridization analysis of TGF β 3 RNA expression during mouse development: comparative studies with TGF β 1 and β 2. *Development* 110, 609-620.
- Pierrou, S., Hellqvist, M., Samuelsson, L., Enerback, S., and Carlsson, P. (1994). Cloning and characterization of seven human forkhead proteins: binding site specificity and DNA bending. *The EMBO journal* 13, 5002-5012.
- Pike, L.J., Marquardt, H., Todaro, G.J., Gallis, B., Casnellie, J.E., Bornstein, P., and Krebs, E.G. (1982). Transforming growth factor and epidermal growth factor stimulate the phosphorylation of a synthetic, tyrosine-containing peptide in a similar manner. *J Biol Chem* 257, 14628-14631.
- Pletsch, N. (2003). Assoziationsanalysen im TGF α - und TGF β 3-Gen bei Patienten mit Lippen-Kiefer-Gaumenspalten und Gaumenspalten. (Marburg: Philipps-Universität Marburg).
- Pratt, R.M., Goggins, J.F., Wilk, A.L., and King, C.T. (1973). Acid mucopolysaccharide synthesis in the secondary palate of the developing rat at the time of rotation and fusion. *Dev Biol* 32, 230-237.
- Proetzel, G., Pawlowski, S.A., Wiles, M.V., Yin, M., Boivin, G.P., Howles, P.N., Ding, J., Ferguson, M.W., and Doetschman, T. (1995). Transforming growth factor- β 3 is required for secondary palate fusion. *Nat Genet* 11, 409-414.
- Radpour, R., Rezaee, M., Tavasoly, A., Solati, S., and Saleki, A. (2007). Association of long polyglycine tracts (GGN repeats) in exon 1 of the androgen receptor gene with cryptorchidism and penile hypospadias in Iranian patients. *Journal of andrology* 28, 164-169.
- Rahman, R.A., Ahmad, A., Rahman, Z.A., Mokhtar, K.I., Lah, N.A., Zilfalil, B.A., and Samsudin, A.R. (2008). Transforming growth factor- α and nonsyndromic cleft lip with or without palate or cleft palate only in Kelantan, Malaysia. *Cleft Palate Craniofac J* 45, 583-586.

Reutter, H., Birnbaum, S., Mende, M., Lauster, C., Schmidt, G., Henschke, H., Saffar, M., Martini, M., Lauster, R., Schiefke, F., *et al.* (2008). TGFB3 displays parent-of-origin effects among central Europeans with nonsyndromic cleft lip and palate. *Journal of human genetics* 53, 656-661.

Rollnick, B.R., and Pruzansky, S. (1981). Genetic services at a center for craniofacial anomalies. *The Cleft palate journal* 18, 304-313.

Romitti, P.A., Lidral, A.C., Munger, R.G., Daack-Hirsch, S., Burns, T.L., and Murray, J.C. (1999). Candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate and maternal cigarette smoking and alcohol consumption: evaluation of genotype-environment interactions from a population-based case-control study of orofacial clefts. *Teratology* 59, 39-50.

Rullo, R., Gombos, F., Ferraraccio, F., Farina, A., Morano, D., Festa, V., Del Viscovo, D., Palmieri, A., Martinelli, M., Scapoli, L., *et al.* (2007). TGF alpha has low protein expression in nonsyndromic clefts. *The Journal of craniofacial surgery* 18, 1276-1280; discussion 1281-1273.

Ryan, R.M., Mineo-Kuhn, M.M., Kramer, C.M., and Finkelstein, J.N. (1994). Growth factors alter neonatal type II alveolar epithelial cell proliferation. *The American journal of physiology* 266, L17-22.

Sader, R. (2009). Rubrik Kinderchirurgie: Lippen-Kiefer-Gaumen-Segelspalten. *Pädiatrie Up2date* 2009; 4(2): 183-205.

Sadler, T.W., Langman, J., and Drews, U. (2003). *Medizinische Embryologie : die normale menschliche Entwicklung und ihre Fehlbildungen*, 10., korrigierte Aufl. edn (Stuttgart [u.a.]: Thieme).

Salomon, D.S., and Pratt, R.M. (1979). Involvement of Glucocorticoids in the Development of the Secondary Palate. *Differentiation; research in biological diversity* 13, 141-154.

San Miguel, S., Serrano, M.J., Sachar, A., Henkemeyer, M., Svoboda, K.K., and Benson, M.D. (2011). Ephrin reverse signaling controls palate fusion via a PI3 kinase-dependent mechanism. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 240, 357-364.

Sasaki, Y., O'Kane, S., Dixon, J., Dixon, M.J., and Ferguson, M.W. (2007). Temporal and spatial expression of Pax9 and Sonic hedgehog during development of normal mouse palates and cleft palates in TGF-beta3 null embryos. *Archives of oral biology* 52, 260-267.

Sassani, R., Bartlett, S.P., Feng, H., Goldner-Sauve, A., Haq, A.K., Buetow, K.H., and Gasser, D.L. (1993). Association between alleles of the transforming growth factor-alpha locus and the occurrence of cleft lip. *American journal of medical genetics* 45, 565-569.

Scapoli, L., Martinelli, M., Pezzetti, F., Palmieri, A., Girardi, A., Savoia, A., Bianco, A.M., and Carinci, F. (2010). Expression and association data strongly support JARID2 involvement in nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Human mutation* 31, 794-800.

Schniewind, B., Groth, S., Sipos, B., Kalthoff, H., Fändrich, F., and Ungefroren, H. (2006). Die ALK5 vermittelte Wachstumsinhibition durch TGF- β in vitro und die Suppression der Tumorgenese beim Pankreaskarzinom in vivo unter besonderer Berücksichtigung des Smad-Signalweges

Chirurgisches Forum 2006. In *Chirurgisches Forum 2006*, H.D. Saeger, K.W. Jauch, and H. Bauer, eds. (Springer-Verlag), pp. 73-75.

Schünke, M., Schulte, E., Schumacher, U., Voll, M., and Wesker, K. (2009). Kopf, Hals und Neuroanatomie : 115 Tabellen, 2., *berarb. und erw. Aufl. edn (Stuttgart [u.a.]: Thieme).

Segal, N.L. (2009). Monozygotic triplets: concordance and discordance for cleft lip and palate / twin research reviews. *Twin research and human genetics : the official journal of the International Society for Twin Studies* 12, 403-406.

Sharpe, P.M., and Ferguson, M.W. (1988). Mesenchymal influences on epithelial differentiation in developing systems. *Journal of cell science Supplement* 10, 195-230.

Shaw, G.M., Rozen, R., Finnell, R.H., Todoroff, K., and Lammer, E.J. (1998). Infant C677T mutation in MTHFR, maternal periconceptional vitamin use, and cleft lip. *American journal of medical genetics* 80, 196-198.

Shaw, G.M., Wasserman, C.R., Lammer, E.J., O'Malley, C.D., Murray, J.C., Basart, A.M., and Tolarova, M.M. (1996). Orofacial clefts, parental cigarette smoking, and transforming growth factor-alpha gene variants. *Am J Hum Genet* 58, 551-561.

Shi, M., Christensen, K., Weinberg, C.R., Romitti, P., Bathum, L., Lozada, A., Morris, R.W., Lovett, M., and Murray, J.C. (2007). Orofacial cleft risk is increased with maternal smoking and specific detoxification-gene variants. *Am J Hum Genet* 80, 76-90.

Shi, M., Murray, J.C., Marazita, M.L., Munger, R.G., Ruczinski, I., Hetmanski, J.B., Wu, T., Murray, T., Redett, R.J., Wilcox, A.J., *et al.* (2012). Genome wide study of maternal and parent-of-origin effects on the etiology of orofacial clefts. *Am J Med Genet A* 158A, 784-794.

Shiang, R., Lidral, A.C., Ardinger, H.H., Buetow, K.H., Romitti, P.A., Munger, R.G., and Murray, J.C. (1993). Association of transforming growth-factor alpha gene polymorphisms with nonsyndromic cleft palate only (CPO). *Am J Hum Genet* 53, 836-843.

Shprintzen, R.J., Siegel-Sadewitz, V.L., Amato, J., and Goldberg, R.B. (1985). Anomalies associated with cleft lip, cleft palate, or both. *American journal of medical genetics* 20, 585-595.

Sivertsen, A., Wilcox, A.J., Skjaerven, R., Vindenes, H.A., Abyholm, F., Harville, E., and Lie, R.T. (2008). Familial risk of oral clefts by morphological type and severity: population based cohort study of first degree relatives. *BMJ* 336, 432-434.

Souza, L.T., Kowalski, T.W., Vanz, A.P., Giugliani, R., and Felix, T.M. (2012). TGFA/Taq I polymorphism and environmental factors in non-syndromic oral clefts in Southern Brazil. *Brazilian oral research* 26, 431-435.

Spielman, R.S., McGinnis, R.E., and Ewens, W.J. (1993). Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet* 52, 506-516.

Strachan, T., and Read, A.P. (2005). Molekulare Humangenetik, 3. Aufl. edn (Heidelberg [u.a.]: Elsevier).

Strien, J., Sanft, J., and Mall, G. (2013). Enhancement of PCR Amplification of Moderate GC-Containing and Highly GC-Rich DNA Sequences. *Molecular biotechnology* 54, 1048-1054.

Suazo, J., Santos, J.L., Silva, V., Jara, L., Palomino, H., and Blanco, R. (2005). [Possible association due to linkage disequilibrium of TGFA, RARA and BCL3 with nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Chilean population]. *Revista medica de Chile* 133, 1051-1058.

- Sun, D., Vanderburg, C.R., Odierna, G.S., and Hay, E.D. (1998). TGFbeta3 promotes transformation of chicken palate medial edge epithelium to mesenchyme in vitro. *Development* 125, 95-105.
- Tabibzadeh, S. (2002). Decoding implantation and menstruation: the tale of two opposing signals. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 7, d1475-1486.
- Tabibzadeh, S., Lessey, B., and Satyaswaroop, P.G. (1998). Temporal and site-specific expression of transforming growth factor-beta4 in human endometrium. *Molecular human reproduction* 4, 595-602.
- Tang, M., Mikhailik, A., Pauli, I., Giudice, L.C., Fazelabas, A.T., Tulac, S., Carson, D.D., Kaufman, D.G., Barbier, C., Creemers, J.W., *et al.* (2005). Decidual differentiation of stromal cells promotes Proprotein Convertase 5/6 expression and lefty processing. *Endocrinology* 146, 5313-5320.
- Tharappel, J.C., Cholewa, J., Espandiari, P., Spear, B.T., Gairola, C.G., and Glauert, H.P. (2010). Effects of cigarette smoke on the activation of oxidative stress-related transcription factors in female A/J mouse lung. *Journal of toxicology and environmental health Part A* 73, 1288-1297.
- Todaro, G.J., Fryling, C., and De Larco, J.E. (1980). Transforming growth factors produced by certain human tumor cells: polypeptides that interact with epidermal growth factor receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 5258-5262.
- Turley, E.A., Hollenberg, M.D., and Pratt, R.M. (1985). Effect of epidermal growth factor/urogastrone on glycosaminoglycan synthesis and accumulation in vitro in the developing mouse palate. *Differentiation; research in biological diversity* 28, 279-285.
- van der Heul-Nieuwenhuijsen, L., Dits, N., Van Ijcken, W., de Lange, D., and Jenster, G. (2009). The FOXF2 pathway in the human prostate stroma. *The Prostate* 69, 1538-1547.
- Vaziri Sani, F., Hallberg, K., Harfe, B.D., McMahon, A.P., Linde, A., and Gritli-Linde, A. (2005). Fate-mapping of the epithelial seam during palatal fusion rules out epithelial-mesenchymal transformation. *Dev Biol* 285, 490-495.
- Victor, A. (2007). Bewertung genetischer Forschungsergebnisse. In *Kriterien zur Bewertung genetischer Testverfahren* (IMBEI, Universität Mainz).
- Vieira, A.R. (2006). Association between the transforming growth factor alpha gene and nonsyndromic oral clefts: a HuGE review. *American journal of epidemiology* 163, 790-810.
- Vieira, A.R., Orioli, I.M., Castilla, E.E., Cooper, M.E., Marazita, M.L., and Murray, J.C. (2003). MSX1 and TGFB3 Contribute to Clefting in South America. *Journal of Dental Research* 82, 289-292.
- Wang, T., Tamakoshi, T., Uezato, T., Shu, F., Kanzaki-Kato, N., Fu, Y., Koseki, H., Yoshida, N., Sugiyama, T., and Miura, N. (2003). Forkhead transcription factor Foxf2 (LUN)-deficient mice exhibit abnormal development of secondary palate. *Dev Biol* 259, 83-94.
- Weigel, D., Jurgens, G., Kuttner, F., Seifert, E., and Jackle, H. (1989). The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the *Drosophila* embryo. *Cell* 57, 645-658.
- Winter, R., Liebold, J., and Schwarz, E. (2013). The unresolved puzzle why alanine extensions cause disease. *Biological chemistry*.

- Wolfe, S.A., and Mejia, M.L. (2013). Staged Rotation Advancements Provide Improved Nasal Results Compared to 1-Stage Repairs in Patients With Complete Bilateral Cleft Lip and Palate. *Annals of plastic surgery*.
- Wotton, K.R., and Shimeld, S.M. (2011). Analysis of lamprey clustered Fox genes: insight into Fox gene evolution and expression in vertebrates. *Gene* 489, 30-40.
- Wyszynski, D.F., Maestri, N., Lewanda, A.F., McIntosh, I., Smith, E.A., Garcia-Delgado, C., Vinageras-Guarneros, E., Wulfsberg, E., and Beaty, T.H. (1997). No evidence of linkage for cleft lip with or without cleft palate to a marker near the transforming growth factor alpha locus in two populations. *Human heredity* 47, 101-109.
- Yildirim, M., Seymen, F., Deeley, K., Cooper, M.E., and Vieira, A.R. (2012). Defining predictors of cleft lip and palate risk. *J Dent Res* 91, 556-561.
- Young, A.V., Hehn, B.M., Sanghera, J.S., Pelech, S.L., and Shah, R.M. (1997). The activation of MAP kinase during vertical palatal shelf development in hamster. *Growth, development, and aging : GDA* 61, 27-38.
- Zeiger, J.S., Beaty, T.H., and Liang, K.Y. (2005). Oral clefts, maternal smoking, and TGFA: a meta-analysis of gene-environment interaction. *Cleft Palate Craniofac J* 42, 58-63.
- Zhang, L., Liu, Y., Song, F., Zheng, H., Hu, L., Lu, H., Liu, P., Hao, X., Zhang, W., and Chen, K. (2011). Functional SNP in the microRNA-367 binding site in the 3'UTR of the calcium channel ryanodine receptor gene 3 (RYR3) affects breast cancer risk and calcification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 13653-13658.
- Zhang, W.G., Luo, S.J., Tang, S.M., and Liang, J. (2004). [The TGF-alpha gene Taq I polymorphism and non-syndromic cleft lip with or without cleft palate]. *Zhonghua zheng xing wai ke za zhi = Zhonghua zhengxing waiké zazhi = Chinese journal of plastic surgery* 20, 190-193.
- Zhu, J., Hao, L., Li, S., Bailey, L.B., Tian, Y., and Li, Z. (2010). MTHFR, TGFB3, and TGFA polymorphisms and their association with the risk of non-syndromic cleft lip and cleft palate in China. *Am J Med Genet A* 152A, 291-298.
- Zhu, X., Ozturk, F., Liu, C., Oakley, G.G., and Nawshad, A. (2012). Transforming growth factor-beta activates c-Myc to promote palatal growth. *Journal of cellular biochemistry* 113, 3069-3085.
- Zimmerman, E.F., Clark, R.L., Ganguli, S., and Venkatasubramanian, K. (1983). Serotonin regulation of palatal cell motility and metabolism. *Journal of craniofacial genetics and developmental biology* 3, 371-385.
- Zuccherro, T.M., Cooper, M.E., Maher, B.S., Daack-Hirsch, S., Nepomuceno, B., Ribeiro, L., Caprau, D., Christensen, K., Suzuki, Y., Machida, J., *et al.* (2004). Interferon regulatory factor 6 (IRF6) gene variants and the risk of isolated cleft lip or palate. *The New England journal of medicine* 351, 769-780.

7 Anhang

Übersicht über die untersuchten Patienten, der zugehörigen Geschlechtskategorisierung und Spaltart (Spaltart wurde vom entnehmenden Arzt identifiziert). Die Träger einer isolierten Gaumenspalte wurden farblich markiert.

| Patient | Geschlecht | Spaltart | Patient | Geschlecht | Spaltart |
|---------|------------|------------|---------|------------|------------|
| 1 | w | GS | 39 | m | LKGS li |
| 2 | w | LKGS re | 40 | m | LKGS li |
| 3 | m | LKGS re | 41 | w | LKGS re |
| 4 | m | LKGS re/li | 42 | m | LKGS li |
| 5 | m | LKGS re/li | 43 | m | LKGS re/li |
| 6 | m | LKGS re/li | 44 | m | LKGS li |
| 7 | w | GS | 45 | w | LKGS re |
| 8 | w | LKGS li | 46 | w | GS |
| 9 | w | GS | 47 | m | LS li |
| 10 | w | LKGS re | 48 | w | GS |
| 11 | m | GS | 49 | w | LKGS re |
| 12-3 | m | LS li | 50 | m | GS |
| 13-3 | w | GS | 51 | m | LKGS li |
| 14 | m | LKGS li/re | 52 | w | LKGS re/li |
| 15 | m | LKGS li/re | 53 | w | GS |
| 16 | m | LS li/re | 54-3 | m | LS li/re |
| 17 | m | LKGS li | 55 | m | LS |
| 18 | w | LKGS li | 56 | m | LKGS re/li |
| 19 | w | LKS li | 57-3 | w | GS |
| 20 | m | LS li | 58 | w | LS |
| 21 | w | GS | 59 | w | LS |
| 22 | w | LKGS li | 60 | m | LKGS re |
| 23 | w | LKGS li | 61-3 | m | LKGS re |
| 24 | w | LKGS li | 62-3 | w | GS |
| 25 | m | LKGS li | 63 | m | LKGS li |
| 26 | w | LKGS li | 64 | m | GS |
| 27 | m | LS li | 65-3 | w | LKGS li |
| 28 | w | LS li | 66-3 | m | LS |
| 29 | m | LS re | 67-3 | m | LKGS re |
| 30 | m | LKGS re/li | 68 | m | GS |
| 31 | w | LKGS re | 70 | w | LKGS re/li |
| 32 | m | LKGS li | 71 | w | GS |
| 33 | w | LKS re/li | 72 | m | GS |
| 34 | w | LKGS re/li | 73 | m | LKGS re |
| 35 | w | LKGS li | 74-3 | m | LKGS re/li |
| 36 | w | LKGS re/li | 75 | w | LKGS li |
| 37 | m | LKGS li | 76 | w | GS |
| 38 | m | LKGS li | | | |

w = weiblich, m = männlich, GS = Gaumenspalte, LKGS = Lippen-Kiefer-Gaumen-(Segel)Spalte, LS = Lippenspalte, LKS = Lippen-Kiefer-Spalte, re = rechts, li = links

8 Lebenslauf

Juliane Strien

Persönliche Informationen

- Geburtsdatum: 11.08.1984
 - Geburtsort: Sömmerda
 - Familienstand: ledig
 - Nationalität: deutsch
 - Wohnhaft in: Leo-Sachse-Str. 36
07749 Jena
-

Bildungsgang

- | | |
|--------------|--|
| Seit 10/2008 | Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Jena (FSU Jena), Abteilung Molekulargenetik |
| 09/2008 | Abschluss als Diplom-Humanbiologin Titel der Diplomarbeit: <i>„Retrospektive Karyotypisierung von Abortmaterial mittels Comparativer Genom Hybridisierung“</i> |
| 2003-2008 | Studium der Humanbiologie <i>Philipps-Universität Marburg</i> Diplomprüfungen: Hauptfach Molekularbiologie/Humangenetik Nebenfach Medizinische Mikrobiologie |
| 06/2003 | Abitur |
| 1995 – 2003 | Prof. Hofmann Gymnasium Kölleda |
| 1991 – 1995 | Sophienschule Buttstädt |
-

8.1 Liste eigener Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge

Publikationen:

Strien, J., Sanft, J., and Mall, G. (2013) **Enhancement of PCR Amplification of Moderate GC-Containing and Highly GC-Rich DNA Sequences**, *Molecular biotechnology* 54, 1048-1054.

Martínez-Ramírez, J., Strien, J., Sanft, J., Mall, G., Walther, G., and Peters, F. (2013). **Studies on drug metabolism by fungi colonizing decomposing human cadavers. Part I: DNA sequence-based identification of fungi isolated from postmortem material**. *Anal Bioanal Chem*, 1-8.

Vorträge:

30. Spurenworkshop der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin, Zürich (2010)
„Vergleich unterschiedlicher Methoden zur RNA-Konzentrationsbestimmung“

Poster:

88. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin, Basel (2009)
„Eignet sich Ultraschall zur Verbesserung der DNA-Extraktion textiler Spurenträger?“

89. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin, Berlin (2010)
„Der Einfluss von Waschprozessen auf den Nachweis von Ejakulat an Textilien“

90. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin, Frankfurt (2011)
„Analysis of transfer of epithelial cells by fingerprints“

91. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin, Freiburg (2012)
„Sicherung von Epithelzellen auf textilen Spurenträgern - Klebeband vs. Vakuumpumpe“

92. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin, Saarbrücken (2013)
„Molekulargenetische Identifizierung von Pilzen aus humanem postmortalen Gewebe“
(Ausgezeichnet mit dem Posterpreis auf dem Gebiet der Forensischen Molekularbiologie)

9 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:.....

Dr. rer. nat. Juliane Sanft

Dr. rer. nat. Michael Hubig,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe

Jena, den 18.07.2013

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt dabei Frau Prof. Dr. Gita Mall und Herrn Prof. Dr. Dr. Stefan Schultze-Mosgau für die Vergabe dieses interessanten Themas, die Bereitstellung des Probenmaterials und die Möglichkeiten und Mittel meine eigenen Ideen zur Thematik umzusetzen.

Frau Dr. Juliane Sanft danke ich für die geduldige Betreuung, die kontinuierliche Motivation und die nützlichen Anregungen, durch die kleinere und größere Stolpersteine während der Durchführung der Studie beseitigt wurden. Außerdem danke ich ihr für die sachliche und konstruktive Kritik am Manuskript und die stets freundschaftliche Atmosphäre, die mich jeden Tag aufs Neue gern zur Arbeit kommen lässt.

Weiterhin geht mein Dank an unsere MTAs Sabine Eska, Adelheid Matern und Kerstin Schlegel für die engagierte Hilfe bei der Laborarbeit und das familiäre Arbeitsklima.

Herrn Dr. Michael Hubig danke ich sehr für die zeitaufwendige statistische Auswertung meiner Ergebnisse.

Cindy danke ich für das intensive Korrekturlesen des Manuskriptes und den unermüdlichen Kampf gegen fragwürdige Kommas.

Herzlich danken möchte ich auch allen Probanden bzw. deren Eltern für ihre Kooperation.

Mein größter Dank gilt jedoch meinen Eltern, meiner Familie und Max für die motivierende Unterstützung und ein stets offenes Ohr während der gesamten Doktorandenzeit.